

Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung mit den
immunsuppressiven Substanzen Cyclosporin A und Rapamycin in einem
akzelerierten Herztransplantationsmodell bei Ratten

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus- Liebig- Universität Giessen

vorgelegt von Jens Ulrich Künzel
aus Salzkotten

Gießen 2000

Aus dem Medizinischem Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie
Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie
Leiter: Prof. Dr. K. Schwemmler

des Klinikums der Justus- Liebig- Universität Giessen

1. Gutachter : Priv. – Doz. Dr. med. Georg Schmidbauer
2. Gutachter : Prof. Dr. Schranz

Tag der Disputation : 21.11.2000

1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Kurzer Abriss der Geschichte der Organtransplantation</i>	1
1.2.	<i>Grundzüge der Transplantationsimmunologie</i>	2
1.3	<i>Immunsuppressive Therapiestrategien zur Prophylaxe und Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen</i>	3
2.	Problemstellung und Zielsetzung	4
2.1.	<i>Problemstellung</i>	4
2.2.	<i>Zielsetzung</i>	7
3.	Materialien und Methoden	8
3.1.	<i>Versuchstiere</i>	8
3.2.	<i>Tierhaltung</i>	8
3.3.	<i>Narkoseverfahren</i>	8
3.4.	<i>Operationsverfahren</i>	8
3.4.1.	Instrumentarium und Nahtmaterial	8
3.4.2.	Operationsvorbereitung	9
3.4.3.	Hauttransplantation	9
3.4.4.	Herztransplantation	9
3.4.5.	Lymphadenektomie	10
3.4.6.	Organentnahme für histologische Untersuchungen	10
3.5.	<i>Kontrolle der Transplantatfunktion und Bestimmung der Transplantatüberlebenszeit</i>	11
3.6.	<i>Transplantationsmodell</i>	11
3.6.1.	Herzallotransplantation (Akzeleriertes Modell)	11
3.7	<i>Verwendete Immunsuppressiva</i>	11
3.7.1.	Cyclosporin A	11
3.7.2.	Rapamycin	12
3.8.	<i>Immunsuppressive Protokolle, Versuchsgruppen und Versuchsanordnung</i>	12
3.8.1.	Donorvorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit RPM	12
3.8.2.	Donorvorbehandlung mit CSA ohne Akzeptorbehandlung	12
3.8.3.	Donorvorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit RPM	12
3.8.4.	Donorvorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung	13
3.8.5.	Kontrollgruppe	13
3.8.6.	Versuchsgruppen und Versuchsanordnung	13
3.9.	<i>Immunhistochemische Untersuchungen</i>	14
3.9.1.	Monoklonale und ployklonale Antikörper	14

3.9.2.	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatasefärbung (APAAP)	15
3.9.3.	Zwei Farben Flowzytometrie zur Bestimmung zirkulierender Antikörper	15
3.10.	<i>In vitro Untersuchungen</i>	16
3.10.1.	Lymphozyteneinzelsuspension	16
3.10.2.	Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)	16
3.11.	<i>Statistische Analyse</i>	17
3.12.	<i>Abkürzungen</i>	18
4.	Ergebnisse	19
4.1.	<i>Kontrollgruppen</i>	19
4.1.1.	Kontrollgruppe Transplantatüberlebenszeiten	19
4.1.2.	Kontrollgruppe Immunhistochemische Untersuchung	19
4.1.3.	Kontrollgruppe zur Analyse zirkulierender Antikörper	20
4.2.	<i>Spendervorbehandlung mit Cyclosporin A (CSA)</i>	22
4.2.1.	Transplantatüberlebenszeiten	22
4.2.1.1	Donorvorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit RPM	22
4.2.1.2.	Donorvorbehandlung mit CSA ohne Akzeptorbehandlung	22
4.2.2.	<i>Immunhistochemische Untersuchung</i>	23
4.2.2.1.	Donorvorbehandlung und Akzeptorbehandlung mit RPM	23
4.2.2.2.	Donorvorbehandlung mit CSA ohne Akzeptorbehandlung	24
4.2.3.	<i>Flowzytometrische Analyse (Bestimmung zirkulierender Antikörper)</i>	25
4.2.3.1.	Donorvorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit RPM	25
4.2.3.2.	Donorvorbehandlung mit CSA ohne Akzeptorbehandlung	27
4.2.4.	<i>Gemischte Lymphozytenreaktion</i>	28
4.3	<i>Donorvorbehandlung mit Rapamycin (RPM)</i>	29
4.3.1.	<i>Transplantatüberlebenszeiten</i>	29
4.3.1.1.	Donorvorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit RPM	29
4.3.1.2.	Donorvorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung	29
4.3.2.	<i>Immunhistochemische Analyse</i>	30
4.3.2.1.	Donorvorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit RPM	30
4.3.2.2.	Donorvorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung	31
4.3.3.	<i>Flowzytometrische Analyse zirkulierender Antikörper</i>	32
4.3.3.1.	Donorvorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit RPM	32
4.3.3.2.	Donorvorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung	33
4.3.4.	<i>Gemischte Lymphozytenreaktion</i>	35

5.	Diskussion	35
5.1.	<i>Spendervorbehandlung mit Cyclosporin A</i>	35
5.1.1.	Bestimmung der Transplantatüberlebenszeiten	35
5.1.2.	Immunhistochemische Untersuchung	36
5.1.3.	Flowzytometrische Analyse zirkulierender Antikörper	38
5.1.4.	Gemische Lymphozytenreaktion	39
5.1.5.	Schlußfolgerungen zur Spendervorbehandlung mit Cyclosporin A	40
5.2.	<i>Spendervorbehandlung mit Rapamycin</i>	41
5.2.1.	Bestimmung der Transplantatüberlebenszeiten	41
5.2.2.	Immunhistochemische Untersuchung	42
5.2.3.	Flowzytometrische Analyse zirkulierender Antikörper	43
5.2.4.	Gemische Lymphozytenreaktion	43
5.2.5.	Schlußfolgerungen zur Spendervorbehandlung mit Rapamycin	44
6.	Zusammenfassung	45
7.	Literatur	48

1. Einleitung

1.1 *Kurzer Abriß der Geschichte der Organtransplantation*

Bereits in der frühen Geschichte der Medizin wurde dem forschenden Mediziner bewußt, daß irreversibel geschädigte Organe, die Ihre Funktion nicht mehr aufrecht erhalten konnten, evtl. durch den Ersatz eines neuen Organes ersetzt werden könnten.

Erst im 20. Jahrhundert wurde durch intensive experimentelle Forschung der medizinische Fortschritt in der Weise gebahnt, daß nun ernsthaft an der Verwirklichung von Organtransplantationen gearbeitet werden konnte. Als Meilensteine in der Entwicklung der Transplantationsmedizin sind heute anzusehen: die Entdeckung der ABO-Blutgruppen durch Landsteiner 1901 (1) sowie die Entwicklung heute noch verwendeter Gefäßanastomosentechniken durch Carell und Guthry (2) in der ersten Dekade des Jahrhunderts. Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt werden die ersten Bluttransfusionen mit Erfolg praktiziert.

In den vierziger Jahren gelingt Lindberg und Carell (2) die Perfusion isolierter Organe; bereits 1950 wird am Mary Hospital Chicago die erste Niere erfolgreich transplantiert, nachdem die weitgehende Übereinstimmung der Spender und Empfängerblutgruppen festgestellt war. Im Jahre 1959 transplantieren Lower und Shumway (2) zum ersten Mal einem Hund ein fremdes Herz, gefolgt von der legendären ersten Herztransplantation am Menschen 1967 durch Barnard (3). Die erfolgreichen Lebertransplantationen ab der zweiten Hälfte der achtziger Jahre runden die Geschichte der Organtransplantation ab. Weiterhin geforscht wird z.B. an Pankreas-inselelltransplantationen, Darmtransplantationen, kombinierten Herz-Lungen-Transplantationen sowie an kompletten Extremitätentransplantationen.

Bis zum Jahre 1996 wurden weltweit ca. 25000 Herzen transplantiert, im Schnitt ca. 2500 pro Jahr, im Jahre 1996 waren es 510 Stck. Bis 1996 wurden weltweit 300000 Nieren transplantiert, im Jahre 1996 alleine 2016 Stck. Es besteht weiterhin ein Bedarf von ca. 1000 Herzen im Jahr, die Warteliste umfasst z.Zt. ca 700 Patienten. Bezüglich der Nierentransplantation besteht ein Bedarf an Spenderorganen von z.Zt. 3500 im Jahr, die Warteliste umfasst z.Zt. ca. 9000 Patienten, das bedeutet eine Wartezeit von 3-4 Jahren. (Eurotransplant, Leiden, NL)

Mit dem Fortschritt der Transplantationsmedizin wurden vornehmlich die Operationstechniken immer weiter verfeinert, ebenso die Techniken zur Gewebeprotektion in den Ischämiephasen während, bzw. nach der Organentnahme, bis zur Reperfusion des Organes nach erfolgter Transplantation im Empfängerorganismus. In der sekundären Phase der Entwicklung einer suffizienten Transplantationsmedizin rückten die Vorgänge der Transplantationsimmunologie immer weiter in den Vordergrund. Nachdem die Ursachen einer Transplantatabstoßung oder Toleranz weitgehend in den Bereich des Immunsystems wiesen (4), rückte dieser Bereich mehr und mehr in den Interessenbereich der Forscher. An der Abstoßungsreaktion schienen vor allem zelluläre und humorale Mechanismen mitzuwirken (5,6,7,8,9).

Auf diesen Bereich konzentriert sich auch heute weiterhin die Forschung, um die Mechanismen der Abstoßung weiter grundlagennah aufzuklären. Das Ziel ist eine dauerhafte Transplantattoleranz zu erreichen mittels immer weiter optimierter immunsuppressiver Therapieprotokolle.

1.2 Grundzüge der Transplantationsimmunologie

Abstoßungsreaktionen beruhen auf einer Immunreaktion gegen körperfremde Antigene des Transplantats. Von Bedeutung sind die HLA-Antigene und die Hauptblutgruppen. Eine ABO-Inkompatibilität führt in der Regel zu einer sofortigen Abstoßung des transplantierten Organes und ist daher in der Transplantationsimmunologie von großer Bedeutung (10).

HLA-Antigene, die zum sog. "major histocompatibility complex" MHC zählen, lassen sich bezüglich ihrer Struktur und Funktion in zwei Klassen einteilen. MHC-Klasse I Antigene werden hauptsächlich auf der Oberfläche von kernhaltigen Organ- und Blutzellen exprimiert. Hingegen findet man auf der Oberfläche von Leukozyten, interstitiellen dendritischen Zellen sowie auf der Oberfläche von Gefäßendothelien sowohl MHC Kl. I, als auch MHC Kl. II Antigene (11). Diese Antigenrepräsentation ist die wichtige Grundlage zur Erkennung des Transplantates als "fremd" im Organismus. Die MHC-Antigen tragenden Zellen des Spenders aktivieren nun selbst direkt oder indirekt die T-Helferzellen (CD4+) des Empfängers, welche nun Lymphokine produzieren, die das Wachstum, die Differenzierung und Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen bewirken.

Es ist weiterhin bekannt, daß gerade diese Lymphokinproduktion eine Schlüsselfunktion innerhalb der Transplantatabstoßung inne hat. Hierbei sind vor allem IL-2, TNF- α , sowie IFN- γ zu erwähnen (12). So stimuliert das IL-2 die CD4+ Zelle selbst, aktiviert zytotoxische T-Zellen (CD 8+) sowie natürliche Killerzellen. IFN- γ steigert die Phagozytose von Makrophagen sowie die Synthese von IL-1, welches eine Stimulierung der CD 4+ Zellen bewirkt (13). Ebenfalls ist bekannt, daß gerade im transplantierten Organ IFN- γ eine gesteigerte Expression von MHC-Antigenen bewirkt (14). TNF- α aktiviert Granulozyten und Makrophagen und reguliert die Proliferation von T- und B-Zellen. TNF- α kann auch direkt zytolytisch wirken.

Weiterhin erwähnenswert ist die chemotaktische Potenz der Lymphokine auf Makrophagen und andere immunkompetente Zellen. So ist z.B. bekannt, daß gerade IFN- γ und TNF- α die Bindung von dendritischen Zellen an Fibronectin fördern, was als ein entscheidender Faktor für die Ermöglichung der Gewebemigration innerhalb des Abstoßungsprozesses angesehen wird (15,16). Dieses komplexe Zusammenspiel von Effektorzellen und ihrer Produkte führt zu einem komplexen Parenchymuntergang bzw. zu einer Zerstörung des Transplantates (17,18,19). Diese Mechanismen treffen weitestgehend auf die akute Abstoßungsreaktion zu, welche die häufigste Ursache von Transplantatverlusten in der Klinik darstellt.

Man kennt noch weitere Spielarten der Abstoßungsreaktionen wie z.B. die hyperakute/akzelerierte -, sowie die chronische Organabstoßung. Auch die chronische Organabstoßung ist im klinischen Alltag für einen nicht unerheblichen Prozentsatz der Transplantatverluste verantwortlich. Dieser Prozeß findet ätiologisch seine Ursachen in z.B. vorausgegangenen Perioden von akuten Abstoßungsreaktionen (20) und humoralen Mechanismen (21). Aber auch in nichtimmunologischen Vorgängen, wie zu langen Ischämiezeiten (22), Perfusions- und Reperfusionsschäden (23), als auch in viralen Infektionen (24). Histologisch dominiert hierbei eine zunehmende interstitielle Fibrose (25).

Chronische Organabstoßung hat einen Zeitrahmen, der in Jahren gefaßt werden kann, während die akute Abstoßung innerhalb der ersten 3 Monate jederzeit post transplantationem auftreten kann. Bei der hyperakuten/akzelerierten Abstoßungsreaktion handelt es sich um eine überwiegend

humoral ausgelöste Organerzörung (26,27,28,29), die innerhalb eines Zeitrahmens von 48 Std., bis zu 5 Tagen p.tx. stattfindet.

Ursächlich sind die erwähnte ABO-Unverträglichkeit anzusehen sowie päformierte zytotoxische Antikörper, die durch eine frühere Sensibilisierung induziert wurden (30,31). Histologisch stehen vor allem Endothelläsionen im Vordergrund, neben Mikrothombosierungen, welche zu ischämischen Nekrosen des Transplantates führen. (26-30,31)

1.3 Immunsuppressive Therapiestrategien zur Prophylaxe und Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen

Erst der Einsatz von Immunsuppressiva hat die Durchführung erfolgreicher Organtransplantationen möglich gemacht. Bei Herz- und Lungentransplantationen wurde ein bemerkenswerter Durchbruch nach der Einführung von CSA (Vgl.3.7.1) möglich. Aber auch in der heutigen Zeit gibt es noch kein allumfassendes Konzept für eine suffiziente Anwendung einer Immunsuppression nach Organtransplantationen; es sieht im Gegensatz dazu so aus, daß im Prinzip jedes Transplantationszentrum ein eigenes Therapieprotokoll entwickelt hat und verfolgt.

Zur immunsuppressiven Therapie stehen heute CSA, Glukokortikoide, Azathioprin sowie verschiedene Antikörperpräparationen (ATG/ALG/OKT3) zur Verfügung und befinden sich im klinischen Einsatz. Da die Erkennung eines allogenen Transplantates hauptsächlich eine Aufgabe der T-Lymphozyten darstellt (17), kommen im wesentlichen T-zellwirksame Immunsuppressiva mit unterschiedlichen Angriffspunkten zur Anwendung.

Grundsätzlich unterscheidet man drei Therapiephasen die sich allesamt auf den Empfänger konzentrieren:

Die perioperative Induktionstherapie, bei der hauptsächlich Glukokortikoide in absteigender Dosierung sowie Azathioprin eingesetzt werden. Hierbei erhalten die Patienten sofort, oder nach Stabilisierung der Transplantatfunktion einige Tage nach der Transplantation, zusätzlich CSA. Auch können die ersten Tage nach der Tx. mit einem Therpieschema, bestehend aus CSA in Kombination mit einem IgG-Antikörper (ATG/OKT3), überbrückt werden (32).

Weiterhin schließt sich die Basis- oder Erhaltungstherapiephase an. Fehlen Risikofaktoren für die Entwicklung einer Abstoßungsreaktion und sollte der Verlauf komplikationslos sein, wird nach einigen Monaten auf eine Basistherapie aus Glukokortikoiden, Azathioprin oder CSA umgestellt.

Im Falle einer akuten Abstoßungsreaktion ist hochdosiertes Prednisolon das Mittel der ersten Wahl. Handelt es sich um eine steroidresistente Abstoßung, werden Antikörper wegen ihrer guten Wirksamkeit zur sog. Rescuetherapie eingesetzt.

Bei einer Langzeittherapie mit Immunsuppressiva muß immer mit einer höheren Inzidenz von Hauttumoren und Lymphomen gerechnet werden, ebenso wie mit Infektionen.

Bei dieser Art der Langzeittherapie müssen auch die spezifischen Nebenwirkungen, z.B. nephrotoxischer Art bei CSA, bedacht werden.

Die Forschung konzentriert sich mittlerweile auf verschiedene Ansatzpunkte um neue besser wirksame immunsuppressive Therpiestrategien zu entwickeln. So werden u.a. neuere

immunsuppressive Substanzen in präklinischen und bereits in klinischen Studien getestet. Zu diesen neuen vielversprechenden Substanzen gehören u.a.:

- Rapamune® (Sirolimus/Rapamycin), vgl.3.7.2. (33,34,35)
- Tacrolimus (FK 506), welches von der molekularen Struktur dem des Rapamycin sehr ähnlich ist und in etwa den gleichen Wirkmechanismus aufweist. (35,36,37,38)
- Leflunomid, ein Inhibitor der Signalübertragung auf intrazellulärer Ebene. Diese Substanz zeichnet sich durch eine Verhinderung der frühen humoralen Immunantwort sowie durch Verhinderung des Antikörperschiffes aus. (39,40,41,42)
- CellCept® (Mycophenolat Mofetil), welches durch eine Inhibition der de novo Purinsynthese die Funktion von T- und B- Zellen supprimiert (43,44,45,46,47).
- Brequinar Sodium, welches ebenfalls ein Antimetabolit der DNS-Synthese darstellt, allerdings auf der Pyrimidinebene (48,49,50).

2. Problemstellung und Zielsetzung

2.1. Problemstellung

Ein Hauptproblem für die Transplantationsmedizin stellt nach wie vor der Mangel an geeigneten Transplantatspendern dar. Nach den Auswahlkriterien (ABO-Kompatibilität, HLA-Match/Mismatch) kommt dann noch ein Mangel an geeigneten Organtransplantaten hinzu. Gerade in Deutschland, aber auch in vielen anderen Ländern in Europa oder Nordamerika, ist in den letzten Jahren die Bereitschaft der Bevölkerung, sich als Organspender zur Verfügung zu stellen, eher als rückläufig zu betrachten, gleichzeitig steigt aber der Bedarf an Organtransplantaten.

Für das Jahr 1999 beziffert eine prospektive Einschätzung einen nicht zu erfüllenden Organbedarf von ca. 3000 Spenderorganen. In den ersten vier Monaten des Jahres 1999 gingen bundesweit die Transplantationen von Nieren um 17 % zurück, von Herzen sogar um 28 % (Transplantationszentrum der Universität Erlangen-Nürnberg). 1998 wurden 3918 Organe in Deutschland transplantiert, 2 % mehr als im Vorjahr 1997(3839) [Eurotransplant, Leiden, NL].

Auch die etablierten immunsuppressiven Therapieprinzipien sind weiterhin als nicht befriedigend zu bezeichnen, so daß zu dem Mangel an Organen ein weiterer Bedarf bei Patienten hinzukommt, die nach Abstoßungskrisen retransplantiert werden müssen.

Da die meisten Organspender in diesem System sog. Kadaverspender sind, ist hierbei natürlich das Problem gegeben, daß auf eine durchzuführende notwendige Transplantation immer erst der Tod eines zur Spende bereiten Menschen notwendig ist; eine makabere Rechnung mit vielen Unbekannten. Um einen Menschen dann explantieren zu können, muß zuerst nach festgelegten Normen der Hirntod festgestellt werden. So ist es in den meisten Ländern *lege artis*, die Organe eines hirntoten Spenders zu transplantieren. Hier ergibt sich ein weiteres Problem, da nach neuesten Untersuchungen von Wilhem et al. bekannt wurde, daß der Hirntod eine Erhöhung eines Chemokins (MIP-1 α) in den Organen verursacht. Dieses bewirkt eine extrem vermehrte Cytokinausschüttung und damit gesteigerte Leukozyteninfiltration in das transplantierte Organ. Der Abstoßungsprozeß wird somit beschleunigt (51).

Der Organbedarf läßt auch den nicht optimalen Spender, den sog. "High Risk" Spender in den Blickpunkt der Transplantationsmedizin rücken. Diese sind Spender, die zum Zeitpunkt der Explantation bereits einen Herzstillstand haben, die jünger sind als 5 Jahre oder älter sind als 60 Jahre (52), Spender mit Vorerkrankungen wie z. B. Hypertonie, Diabetes, malignen Erkrankungen sowie mit Infektionserkrankungen (z.B. Hepatitis B/C) (53). Es gibt in diesem Bereich einige positive, aber auf lange Sicht noch nicht befriedigende Fortschritte (54).

Auch Organe von Spendern, die nicht MHC-Kompatibel sind sowie solche, gegen die der Empfänger in irgendeiner Weise bereits sensibilisiert ist, werden versucht, mit intensivierten immunsuppressiven Therapiestrategien erfolgreich zu erhalten (55,10).

Diese Problemstellung setzt neue Überlegungen in Kraft, welche in die Richtung einer Forcierung der Lebendspende gehen. Diese ist in Deutschland nur unter Verwandten, aber in anderen Ländern wie z.B. den USA auch unter nicht verwandten Familienangehörigen oder gar Freunden, möglich. Es ist bereits hinlänglich bekannt, daß Organe von Lebendspendern eine bessere Prognose bzw. Überlebenschance, aufweisen, als jene von Kadaverspendern. Dieses wird durch neueste Studien bekräftigt (56). Um auch bei dieser Art der Spendersuche weitere Möglichkeiten zu erschließen wurde untersucht, ob auch die Lebendspende von nicht Verwandten gute Ergebnisse zeigen würde. Dieses wurde in einer Studie von Cecka et al. an 1000 nicht verwandten Nierenspendern bewiesen und als sehr wertvolle Alternative zur Kadaverspende bewertet (57).

Da bei allen Organen, als Ausnahme ist nur das Herz anzusehen, eine Lebendspende möglich ist, ergibt sich daraus ebenfalls die Möglichkeit, immunsuppressive Therapiestrategien zu entwickeln, die bereits den Spender miteinbeziehen. Da hierbei z.B. der zeitliche Aspekt bzgl. des Transplantationstermins als elektiv anzusehen ist, hätte man die Möglichkeit einer immunsuppressiven Therapie des Spenders, die sich dann in einem Zeitrahmen vor dem geplanten Transplantationstermin bewegen könnte.

Beim Totspendersystem hat man lediglich ein kleines Zeitfenster zur Verfügung, um den Spender therapeutisch miteinzubeziehen.

Bei einer Intention zur Spendervorbehandlung stellt sich die Frage, wo diese ansetzen könnte.

Es ist bekannt, daß der Hauptstimulus für eine Abstoßungsreaktion bei der Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APC's) des Spenderorganismus liegt (58). Solche APC's können auch sog. "passenger cells" sein, die hauptsächlich aus Leukozyten bestehen. Es wurden hierbei gewebeständige dendritische Zellen nachgewiesen, die p.tx. im gesamten Organismus des Empfängers nachzuweisen waren (59). Aber auch T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen sind in dieser Hinsicht nachgewiesen worden (60,61). Dieser Vorgang, auch Chimaerismus genannt, impliziert die Migration dieser verschiedenen Zelllinien in beide Richtungen, d.h. vom Spendergewebe zum Empfänger, sowie in entgegengesetzte Richtung (62,63,64,65). Hierbei kommt es zunächst zu einer weitestgehenden Vernichtung der Donorzellen in den ersten 4 Wochen p.tx. durch eine Interaktion zwischen Donorzellen und der Akzeptorimmunantwort.

Es kann allerdings auch zu einer langen Überlebensdauer von Donorzellen im Empfängergewebe kommen (66). Diesen Vorgang nennt man Microchimaerismus. Die Auswirkung des Chimaerismus/Microchimaerismus auf eine Transplantatabstoßung oder eine Toleranzinduktion wird auch heute noch in der Literatur kontrovers diskutiert (67). Es gibt viele Studien, die diesem

Phänomen die Möglichkeit einer Toleranzinduktion zuschreiben (68,69). Wahrscheinlich sind es vor allem haematopoetische Stammzellen des Donors, die dieses Phänomen bewerkstelligen (70,71,72,73,74,75).

Es gibt allerdings neuere Untersuchungen, die den Spenderzellchimaerismus als Auslöser bzw. alleinigen Auslöser einer Toleranzinduktion in Frage stellen (60,67,76,77,78,79).

Auf der anderen Seite wird immer wieder in Studien berichtet, daß es vor allem aus dem Spender stammende APC's sind, die den Abstoßungsprozeß induzieren und beschleunigen. So beschrieben einige Arbeitsgruppen, daß z.B. nach einer weitestgehenden Entfernung dieser Zellen aus dem Transplantat, die Abstoßungsreaktion milder, verzögert oder auch gar nicht mehr stattfand (58,70,80,81,82,83).

Diese These unterstützend beschrieben Steptoe et al. und Qian et al. die beschleunigte Abstoßung von Herztransplantaten und Lebertransplantaten bei künstlicher Erhöhung der Zahl der dendritischen Zellen im Transplantat vor der Transplantation (84,85). Levenson et al. fanden heraus, daß das Migrationsverhalten ebenfalls entscheidend ist, um eine Immunantwort zu provozieren. Blieben die Spenderleukozyten vornehmlich im Transplantat, so fanden sich eher Hinweise auf eine Toleranzinduktion; kam es dagegen zu einer verstärkten Ausschwemmung dieser Zellen in den Empfängerorganismus, wurde die Abstoßungsreaktion beschleunigt (86).

Um diesen Phänomenen Rechnung zu tragen, wäre hier der Ansatzpunkt einer effektiven Spendervorbehandlung zu sehen. Eine immunsuppressive Therapie, die auf das Transplantat bzw. den Spenderorganismus kurzzeitig einwirkt, ohne ihm zu schaden, aber effektiv genug ist, um auf die APC's des zu transplantierenden Organes einzuwirken, könnte eine wirksame Zusatzmaßnahme zu den bereits etablierten immunsuppressiven Therapiemodellen darstellen. Diese Therapie könnte medikamentös oder in Form einer Strahlentherapie durchgeführt werden (82).

Bereits 1978 fanden Soots und Häyry heraus, daß eine solche Spendervorbehandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika, antineoplastischen Antibiotika, Immunsuppressiva und Kombinationen aus diesen effektiv sein kann (87). Diese Untersuchungen fanden in einem Herztransplantationsmodell bei Ratten statt.

Weitere Studien belegen die Intention einer Spendervorbehandlung. So bewiesen Kahn et al. die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung mit Methotrexat ebenfalls in einem Herztransplantationsmodell bei Ratten (88). Grochowiecki et al. entdeckten die Wirksamkeit einer Mitomycin C-Vorbehandlung von Pankreasinseldtransplantaten in einem xenogenen Ratten-Maus-Transplantationsmodell (89). Hayashi et al. verwendeten erfolgreich FK 506 in einer Spendervorbehandlung in einem xenogenen Hamster-Ratten-Herztransplantationsmodell (90).

Auch die Effizienz einer Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon in einem akzelerierten Herztransplantationsmodell bei Ratten wurde von Schmidbauer et al. bereits nachgewiesen (91). Chen et al. führten bereits Versuche zu einer Transplantat- sowie einer Spendervorbehandlung mit Rapamycin durch. Diese Versuche fanden in einem chronischen Darm- und Nieren-Abstoßungsmodell bei Ratten statt. Es wurden durchaus positive Wirksamkeitsaspekte für Rapamycin nachgewiesen (92,93).

Ebenfalls für Cyclosporin A wurde eine Wirksamkeit als Mittel zur Spendervorbehandlung in einem chronischen Abstoßungsmodell bei der Darmtransplantation in Ratten von de Bruin et al. nachgewiesen (94). In einem konkordanten Hamster-Ratten-Herztransplantationsmodell wiesen Jensen et al. die Wirksamkeit einer Vorbestrahlung des Transplantates, als auch die Wirksamkeit einer Kombination aus Vorbestrahlung und Cyclosporintherapie des Transplantates nach (95). Ähnliche Ergebnisse sind in Studien zur Wirksamkeit von CSA bei einer Transplantat- und Spendervorbehandlung von weiteren Arbeitsgruppen berichtet worden (132,133,134).

Eine Erweiterung des Spektrums an Organspendern durch "high risk Spender" im Bereich der Lebendspende würde die grundlegende Organknappheit weiter verbessern. Wie bereits oben beschrieben werden solche Spender im Kadaverspendersystem miteinbezogen. Interessant sind hierbei Spenderorgane, auf die der Empfängerorganismus durch eine früher stattgefundene Sensibilisierung reagieren könnte (10). Solche Empfänger reagieren auf ein solches Organ mit einer akzelerierten Abstoßungsreaktion (Vgl. 1.2./3.6.1).

Bis zu 40% der niereninsuffizienten Patienten sind als sensibilisiert zu betrachten (96,30), ähnliches kann man von retransplantierten Patienten behaupten (97,98).

Bluttransfusionen und Schwangerschaft sind weitere Riskofaktoren, ganz zu Schweigen von dem 1% der Gesamtbevölkerung, die ohne vorausgegangene Sensibilisierung einen positiven Antikörpersuchtest aufweisen (99,100).

Alle diese Patientengruppen weisen ein viel höheres Risiko für einen Transplantatverlust auf, als der unsensibilisierte Transplantatempfänger.

2.2. Zielsetzung

Diese beiden Situationen (Lebendspendenvorbehandlung, sensibilisierter Empfänger) zu simulieren und als Verbund zu sehen soll der Zweck dieser Untersuchung sein.

Wir untersuchen die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung mit den beiden immunsuppressiven Substanzen Rapamycin und Cyclosporin A im einem akzelerierten Herztransplantationsmodell bei Ratten.

Die Wirksamkeit dieser beiden immunsuppressiven Substanzen auf die akzelerierte Abstoßungsreaktion bei primär vaskularisierten Herztransplantaten wurde bereits bewiesen (101,102,103). Ebenso ergaben sich in bereits stattgefundenen oben erwähnten Voruntersuchungen Hinweise auf die Wirksamkeit dieser Substanzen bei einer Anwendung innerhalb der Spendervorbehandlung. Diese Untersuchungen werden in einem Herztransplantationsmodell an Ratten durchgeführt.

Es bekommt ein gegen Donorgewebe sensibilisierter Empfänger ein mit den erwähnten Substanzen vorbehandeltes Herz transplantiert. Die Transplantatvorbehandlung geschieht durch eine Vorbehandlung des gesamten Spenderorganismus mit immunsuppressiv wirksamen Dosen.

So wird eine wirksame Vorbehandlung eines Lebendspenders simuliert.

Die Charakterisation der Immunantwort des Empfängers unter diesem Therapieschema ist der Untersuchungsgegenstand.

Zunächst soll die Überlebenszeit der Transplantate bei dieser Form des Therapieregimes ermittelt werden. Daraufhin wird in Form von histochemischen Untersuchungen die Spezifikation der

Zellinfiltration im Transplantat erfolgen. Die Antikörperimmunantwort des Empfängers wird anhand von flowzytometrischen Bestimmungen über einen definierten Zeitverlauf detektiert. Ebenso wird die Fähigkeit zur Erkennung der fremden MHC-Genprodukte durch T-Zellen unter diesem Therapiekonzept in einer gemischten Lymphozytenreaktion überprüft. Näheres zur Methodik vgl. Kapitel 3.

3. Materialien und Methoden

3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Inzuchtratten verschiedener Stämme mit einem mittleren Gewicht von 180-220 g, die von der Fa. Charles River Deutschland GmbH bezogen wurden. Es wurden Lewis Ratten (Lew, RT 1⁺) für die Herzallotransplantation als Empfängertiere verwendet.

Als Herzspender und Hautspender sowie als Pool für Stimulatorzellen für die gemischte Lymphozytenreaktion kamen Brown-Norway Ratten (BN, RT 1ⁿ) zum Einsatz.

3.2. Tierhaltung

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Versuchstiere in Gruppen von jeweils zwei Ratten pro Käfig in einem normal klimatisiertem Tierstall gehalten. Es herrschte ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus. Als Nahrung diente pelletierte Fertignahrung, bezogen von der Fa. Altromin, Lage; Trinkwasserzufuhr ad libidum.

3.3. Narkoseverfahren

Sämtliche operativen und therapeutischen Eingriffe wurden in Methyläthernarkose durchgeführt. Zuerst wurden die Tiere in einer mit Äther angereicherten Glaskammer betäubt und anschließend um die Narkose aufrechtzuerhalten wurde den Tieren ein Zentrifugenröhrchen, welches mit äthergetränkten Kompressen gefüllt war, über die Schnauze gestülpt. Der Methyläther zu Narkosezwecken wurde bezogen von der Fa. Hoechst AG, Frankfurt/Main.

3.4. Operationsverfahren

3.4.1. Instrumentarium und Nahtmaterial

Für sämtliche operativen Eingriffe fanden gereinigte aber nicht sterilisierte chirurgische und mikrochirurgische Standardinstrumente Verwendung.

Die Gefäßanastomosen wurden mit Hilfe einer Lupenbrille (Opti Visor, Donegan Optical Company, Lenaxa, KA, USA, Vergrößerung 2,5 fach) genäht. Zum Anschlingen der Gefäße wurden 3/0 Seidenfäden (Perma-Hand Seide) und zur Naht der Anastomosen 7/0

Polypropylenfäden (Prolene) benutzt. Für die Hauttransplantate sowie für die Hautnähte fanden 4/0 Polypropylenfäden (Prolene) Verwendung.

Das gesamte Nahtmaterial stammte von der Fa. Ethicon GmbH, Voerderstedt.

3.4.2. Operationsvorbereitung

Die sich in der Narkose befindlichen Tiere wurden im Bereich des Operationsgebietes rasiert und mit einem Hautdesinfektionsmittel (Softasept N, B. Braun Melsungen AG) desinfiziert; beim Herzspender im Bereich des Thorax, beim Empfänger im Bereich des Abdomens, beim Hautspender und Hautempfänger im Bereich der Flanken.

3.4.3. Hauttransplantation

Es wurden von einem BN-Spendertier sechs 2,5 x 2,5 cm große Vollhautlappen entnommen. Beim Lewis-Empfängertier wurden zwei entsprechend große Hautdefekte geschaffen und mit jeweils einem Vollhautlappen gedeckt und in fortlaufender Nahttechnik fixiert. Um ein Einwachsen ohne Irritationen zu gewährleisten und um die Ratte vom Nagen an den Transplantationsstellen abzuhalten, erhielt die Lew-Ratte einen Sprühverband (Band-Aid, Johnson & Johnson Medical GmbH) direkt nach der Transplantation.

3.4.4. Herztransplantation

Zur Anwendung kam die von Ono und Lindsay beschriebene Technik der heterotopen Herztransplantation (104).

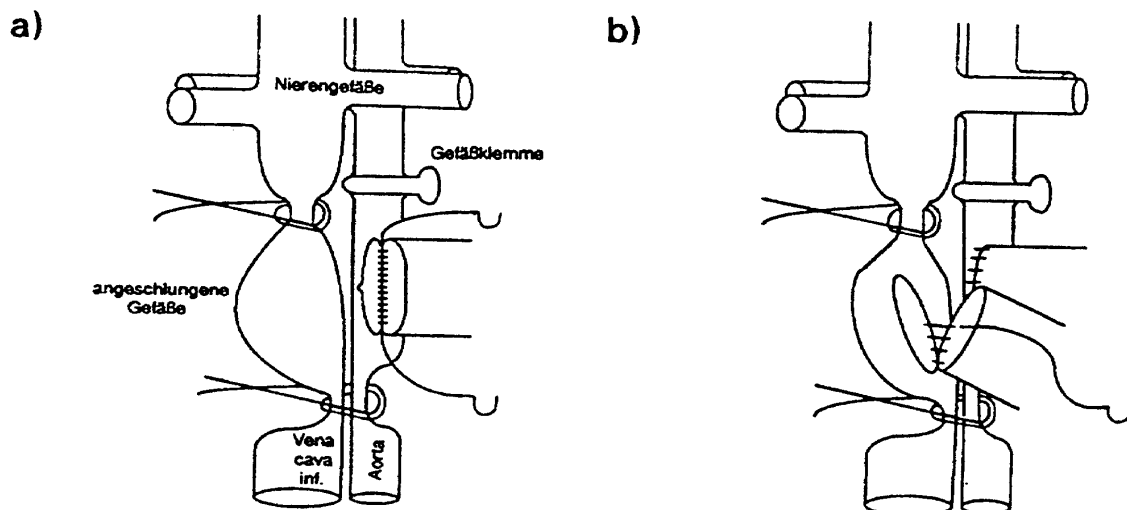


Abb. 1 : Operative Technik der Heterotopen Herztransplantation bei der Ratte:

a) Fertigstellung der Aorten Anastomose, b) Fertigstellung der Pulmonalarterienanastomose, beide Anastomosen in der End-zu-Seit Technik.

Nachdem die Empfängerratte (LEW) median laparotomiert wurde, konnte das Darmkonvolut nach lateral luxiert werden. Daraufhin wurden die Vena cava inferior sowie die Aorta abdominalis freipräpariert. Sodann wurden die Gefäße caudal der Nierengefäßabgänge und proximal der Bifurkation mit 4/0 Seidenfäden angeschlungen. Nach dem Schließen der Ligaturen und dem Einsetzen einer mikrochirurgischen Bulldogklemme caudal des Nierengefäßabganges der Aorta erfolgte die Inzision in die Aorta. Nach Erweiterung der Inzision, ca. 1 mm insgesamt, nach caudal und cranial, wurden die Schnittenden mit 7/0 Prolenefäden angeschlungen.

In einem zweiten Schritt wurde beim Spendertier (BN-Ratte) durch Thorakotomie und Hochklappen der ventralen Brustwand das Herz freigelegt und freipräpariert. Daraufhin wurden die Venae cavae superior et inferior vor ihrer Einmündung in den rechten Vorhof und die Venae pulmonales vor ihrer Einmündung in den linken Vorhof ligiert.

Als nächstes folgte die Durchtrennung von Aorta ascendens und Arteria pulmonalis sowie die Herzentnahme. Nun wurde das entnommene Herz mit 10 ml ungekühlter physiologischer Kochsalzlösung über die Aorta bzw. die Koronarien gespült. Hierdurch konnte sichergestellt werden, daß jegliches Blut aus Vorhöfen, Ventrikel und Koronarstrombahn entfernt wurde. Das entnommene Herz konnte nun im Abdomen des Empfängertieres platziert werden und mittels End-zu-Seit-Anastomosen an die großen Bauchgefäße durch fortlaufende Gefäßnaht angeschlossen werden (Aortenstumpf zu Aorta abdominalis, Pulmonalarterienstumpf zu Vena cava inf.).

Weiter fortfahrend konnten die Ligaturen, zuerst die venösen, daraufhin die arteriellen, gelöst werden. Mit der nun einsetzenden Reperfusion des Herzens begann es nach wenigen Sekunden zu schlagen, ohne jedoch eine hämodynamisch funktionelle Bedeutung zu erlangen.

Als letzten Schritt wurde das Abdomen mittels fortlaufender Nahttechnik in zwei Schichten verschlossen. Die durchschnittliche Operationsdauer betrug 45 min, die Ischämiezeit des Herzens weniger als 20 min.

3.4.5. Lymphadenektomie

Zunächst wurden die Tiere vor der Entnahme der Lymphknoten exsanguiniert, um Kontaminationen durch Erythrozyten vorzubeugen. Für beabsichtigte *in vitro* Untersuchungen mußte hierbei steril vorgegangen werden.

Die zervikalen und axillären Lymphknoten konnten leicht durch Freipräparieren der Hautschichten in den bestimmten Bereichen dargestellt und daraufhin exstirpiert werden.

3.4.6. Organentnahme für histologische Untersuchungen

Hierbei handelte es sich um die Entnahme der Herzallotransplantate am ersten Tag und am siebten Tag nach erfolgter Transplantation, um immunhistochemische Färbungen durchzuführen.

Hierfür wurden die Tiere ebenfalls exsanguiniert nach medialer Laparotomie und Darstellung des Transplantates. Daraufhin erfolgte die Transplantatentnahme durch Abtrennen der Gefäßstümpfe an der Anastomosennaht.

3.5. Kontrolle der Transplantatfunktion und Bestimmung der Transplantatüberlebenszeit

Die Herzkontraktionen wurden täglich durch Palpation in der Flanke des Empfängertieres überprüft. Ein Herz wurde als abgestoßen bezeichnet, wenn keine Herzaktion mehr palpabel war. Dieser Tag wurde als Abstoßungstag definiert. Blieben Zweifel bezüglich der vollständigen Abstoßung, wurde das Empfängertier explorativ laparotomiert, um die Transplantatfunktion visuell zu beurteilen.

3.6. *Transplantationsmodell*

3.6.1. Herzallotransplantation (Akzeleriertes Modell)

Innerhalb dieses Modells wird heterotop transplantiert.

Das Empfängertier erhält 7 Tage vor der eigentlichen Herztransplantation zwei Hauttransplantate jeweils an beiden Flanken. Diese Hauttransplantate stammen vom Spenderstamm. Auf diese Weise wird das Empfängertier spezifisch gegen das Spendergewebe sensibilisiert.

Aus früheren Untersuchungen (102,103) geht hervor, daß Lewis-Empfängertiere, die ein BN-Hauttransplantat erhalten haben, unbehandelt ein 7 Tage später erhaltenes LBNF₁ Herzallotransplantat binnen 24 -36 Stunden abstießen.

In diesem Modell unterscheidet man eine Sensibilisierungsphase (Tag -7 bis 0) und eine Effektorphase (Tag 0 bis 6) (105) .

3.7. *Verwendete Immunsuppressiva*

3.7.1. Cyclosporin A (CSA)

Cyclosporin A wurde in Form des handelsüblichen Medikamentes “*Sandimmun*“ von der Sandoz AG, Nürnberg, bezogen. Ursprünglich wurde die Substanz als Pilzprodukt (*Tolypocladium inflatum*) auf seine antimykotische Wirkung hin untersucht, bald kam aber auch seine immunsuppressive Wirkung zum Vorschein (106,107).

CSA wird in die Zielzelle aufgenommen und an ein zytoplasmatisches Protein (Cyyclophilin) gebunden in den Zellkern transportiert. Hier findet eine Hemmung der Produktion von Interleukinen auf Transkriptionsebene statt. Zielzellen sind besonders jene der T-Zell-vermittelten, zellulären Immunantwort (106,107). Es wurde eine Toleranzinduktion über MHC-Grenzen hinweg ebenso, wie eine wirksame Unterdrückung der graft versus host disease (GVHD) für diese Substanz bewiesen (108,109,110). Cyclosporin wird mit gutem Erfolg verwendet, um Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen zu verhindern.

Darreichungsform :

CSA wurde als bereits bestehendes Infusionslösungskonzentrat mit 0.9%iger Natriumchloridlösung verdünnt i.p. appliziert. Die Dosis betrug 10 mg/kg/Tag.

3.7.2. Rapamycin (RPM)

Rapamycin wurde von Wyeth-Ayerst Research Laboratory, Princeton, New Jersey, USA, zur Verfügung gestellt. Entdeckt wurde Rapamycin von Vezina und Sehgal in den 70er Jahren als Fermentationsprodukt des Pilzes *Streptomyces hygroscopicus* (111,112).

Rapamycin hat eine ausgezeichnete antimycotische Wirkung, jedoch keine antimikrobielle (113). Ebenfalls wirkt Rapamycin antiproliferativ und immunsuppressiv (114). Die immunsuppressiven Eigenschaften sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vorhanden (115,113). RPM inhibiert den Ca^{2+} -abhängigen und unabhängigen antimitogenen und mitogenen Aktivierungsweg bei Menschen, Mäusen und Schweinen (115,116,117). Die Synthese von Zytokinen bleibt unbeeinflusst. RPM wirkt im späten Zellzyklus und blockiert den Übergang von T-Zellen in die S-Phase (115,116). Ebenfalls wird die Proliferation von B-Zelllinien gehemmt (118) sowie die Immunglobulinproduktion von menschlichen B- Zellen vermindert. (119)

Darreichungsform :

Rapamycin wurde in 0.2% Carboxymethylcellulose mit geringer Viskosität suspendiert (Sigma, St.Louis, Mo, USA) und in einer Konzentration von 0,25 mg /kg/Tag i.p. appliziert.

3.8. *Immunsuppressive Protokolle, Versuchsgruppen und Versuchsanordnung*

3.8.1. Donorvorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit RPM

Hierbei wurde die Spenderratte mit den oben angegebenen Dosen CSA an jeweils 3 Tagen vor dem Transplantationstag (Tag 0) behandelt. Ab dem Tag der Herztransplantation (Tag 0) bekam die Empfängerratte pro Tag in der angegebenen Dosis RPM bis zum Abstoßungstag, jedoch nicht länger als 7 Tage.

3.8.2. Donorvorbehandlung mit CSA ohne Akzeptorbehandlung

Bei diesem Protokoll wurde die Spenderratte wie im Protokoll 3.8.1. behandelt .

Eine weitere Behandlung der Empfängerratte ab dem Transplantationstag in der Effektorphase mit Rapamycin fand nicht statt.

3.8.3. Donorvorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit RPM

Es wurde die Spenderratte mit RPM in oben erwähnter Dosis (Tag -3 bis -1 einschl.) behandelt.

Ab dem Transplantationstag bekam die Empfängerratte ebenfalls RPM in gleicher Dosierung pro Tag bis zum Abstoßungstag, jedoch nicht länger als 7 Tage.

3.8.4. Donorvorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung

Bei der Medikation der Spenderratte wurde so vorgegangen wie unter 3.8.3. beschrieben. Ab dem Transplantationstag fand keine Behandlung der Empfängerratte statt.

3.8.5 Kontrollgruppe

Hierbei wurde die Spenderratte nicht medikamentös vorbehandelt, ebenso fand keine Medikation der Empfängerratte statt.

3.8.6 Versuchsgruppen und Versuchsanordnung

Diese Untersuchung wurde primär in drei Hauptgruppen unterteilt: zum einen in die Gruppe zur Untersuchung einer Spendervorbehandlung mit Cyclosporin A, zum anderen in die Gruppe zur Untersuchung einer Spendervorbehandlung mit Rapamycin sowie in eine Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung.

Innerhalb dieser Hauptgruppen wurde das Vorgehen weiter unterteilt in eine Anordnung, wie sie den oben beschriebenen Therapieprotokollen entspricht. Es wurden weitere Untergruppen gebildet, um die verschiedenen Untersuchungsmethoden innerhalb der Therapieprotokolle anzuwenden.

Diese Untergruppen bestehen im einzelnen aus Gruppen zur Bestimmung der Transplantatüberlebenszeit, Gruppen zur immunhistologischen Untersuchung, derer zur Bestimmung der zirkulierenden Antikörper sowie Untergruppen zur Durchführung der MLR.

Donorvorbehandlug mit CSA	mit Akzeptor- behandlung (RPM)	MLR FACS APAAP ÜZ
	ohne Akzeptor- behandlung	FACS APAAP ÜZ
Donorvorbehandlung mit RPM	mit Akzeptor- behandlung (RPM)	MLR FACS APAAP ÜZ
	ohne Akzetor - behandlung	FACS APAAP ÜZ

Abb 2: Versuchsgruppen: MLR: gemischte Lymphozytenreaktion / FACS: Zwei-Farben-Flowzytometrie zur Bestimmung zirkulierender Antikörper / APPAP: Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase Färbung / ÜZ: Transplantatüberlebenszeiten

3.9. Immunhistochemische Untersuchungen

Die immunhistochemische Untersuchung dient zur Charakterisierung der Zellinfiltration während der immunologischen Auseinandersetzung des Empfängerorganismus mit dem Transplantat. Es sollen an akzelerierten Abstoßungsreaktionen typisch beteiligte Zellen nachgewiesen werden sowie das Ausmaß der Gewebeeinfiltration bzgl. der Therapieschemata überprüft werden. Weiterhin soll die Zytokinproduktion im Transplantat dargestellt werden.

Auch werden spezifische Glykoproteine (Tenascin/Fibronectin) nachgewiesen und bzgl. ihrer Expressionsstärke unter dem Therapieregime untersucht. Diese Glykoproteine sind für die Migration immunkompetenter Zellen verantwortlich.

3.9.1. Monoklonale und polyklonale Antikörper

Für die Färbungen wurden folgende Maus-anti-Ratte-Antikörper mit der jeweils angegebenen Zelltypisierung benutzt:

Antikörper:	Zelltypisierung:
MRC OX-33	B-Zellen
W 3/25	T-Helfer/Inducer-Zellen, Makrophagen
MRC OX-39	stimulierte T-Zellen
MRC OX-3	Klasse II MHC-Antigen
MRC OX-19	T-Zellen
ED 1	mononukleäre Phagozyten
MRC OX-8	T-Suppressorzellen , zytotoxische Zellen

Bezogen wurden diese Antikörper von der Firma Camon Labor-Service GmbH, Wiesbaden.

CY-047 IFN- γ (Innogenetics, Antwerpen, NL)

Polyklonale Antikörper:

CY-051 TNF- α (Innogenetics, Antwerpen, NL)
5B01 Tenascin (Biomol Feinchemikalien GmbH , Hamburg)

EB02 Fibronectin (Biomol Feinchemikalien GmbH , Hamburg)

3.9.2. Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatasefärbung (APPAP)

Es wurde eine Dreischichten-Technik entsprechend der APAAP-Methode angewendet. Etwa 2x3mm³ große Gewebestücke der zu untersuchenden Herztransplantate wurden auf Korkplättchen fixiert (Tissue-Tek, Sakura Finetek Eurp., Zoeterwoode, NL), in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei - 80 ° C bis zur weiteren Färbung aufbewahrt. Kryogeschnittene Serienschnitte (4 μ m) wurden 10 min. in Aceton fixiert und mit 10 % (v/v) normalem Rattenserum zur Vermeidung unspezifischer Bindungen blockiert. Dieser Ansatz wurde sodann mit den optimal verdünnten (RPMI) primären Antikörpern bei Raumtemperatur 30 min lang inkubiert.

Als überbrückende zweite Schicht wurde ein Kanninchen-anti-Maus-Antikörper (Dako, Glostrup, DK) für 30 min. bei Raumtemperatur aufgetragen. Als nächster Schritt folgte die Inkubation der Schnitte für 30 min. mit dem APAAP-Komplex (Dako, Glostrup, DK) welcher 1:50 in RPMI (Seromed Biochrom KG, Berlin) verdünnt wurde. Nach einem kurzen Waschen der Schnitte folgte eine wiederholte Inkubation der Schnitte mit dem Kanninchen-anti-Maus-Antikörper für 10 min. sowie mit dem APAAP-Komplex ebenfalls für 10 min. Für die Färbung von Tenascin, Fibronectin und TNF- α wurden die Schnitte nach Fixation und Blockade ebenfalls mit dem Kanninchen-anti-Maus-Antikörper als zweite Schicht überlagert, als dritte Schicht diente ein Maus-anti-Kanninchen-Antikörper (Dako, Glostrup, DK).

Als vierte Schicht kam nun wieder der APAAP-Komplex zur Anwendung. Auch hierbei erfolgte eine Wiederholung der letzten beiden Schritte in den angegebenen Zeitintervallen.

Die so behandelten Schnitte wurden in einer Entwicklungslösung, die 100 mg Laramisol, 75 mg Natriumnitrit, 500 μ l Neufuchsin, und 125 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat enthielt, 30 min. auf Eis inkubiert und entwickelt. Zur Gegenfärbung diente Hämalaun (Merck, Darmstadt).

Auswertung:

Die markierten Zellen wurden in wenigstens 15 repräsentativen Ausschnitten unter 400-facher Vergrößerung mit Hilfe eines okulären Netzmikrometers ausgezählt. Daraus wurde der Mittelwert mit Standardabweichung pro Probe errechnet. Transplantate von akzeleriert abstoßenden, unbehandelten Ratten dienten als Positivkontrolle. Die immunologische Zellkonstellation im Herzbiopsat von Tieren mit isolog transplantierten Herzen diente als Negativkontrolle. Die Beurteilung der Zytokin- und Endothelfärbung wurde semiquantitativ vorgenommen. Je nach Ausmaß der extrazellulären (Zytokine) oder kontinuierlichen (Endothel) Anfärbung wurde diese als < 10%, 10-20%, 20-50%, 50-80 %, oder > 80% der Zellen bzw. des Endothels ausgedrückt.

3.9.3. Zwei-Farben-Flowzytometrie zur Bestimmung zirkulierender Antikörper

Die Antikörper wurden aus Serumproben bestimmt. Hierzu wurde dem vorgesehenen Versuchstier ca. 1ml Blut aus dem Schwanz entnommen. Die Blutproben wurden hiernach sofort bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert. Weiterführend fand eine Entfernung des Serums statt.

Als nächster Schritt erfolgte eine Inaktivierung der Proben bei 56°C für 30 min.. Aus den Halslymphknoten von BN-Ratten gewonnene Lymphozyten dienten als Markerzellen für die flowzytometrische Färbung. Die Lymphozyten wurden in 0.02 %igen NaN (PBS-BSA-AZ) Lsg. in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Proben von 20 μ l verdünnter Serumproben (1:4--1:128) wurden für 30 min. bei 4 °C inkubiert. Um gleichzeitig IgG- und IgM -Alloantikörper zu färben, wurden die Zellen mit 50 μ l PBS-BSA-AZ Lsg. für weitere 30 min. bei 4°C inkubiert. Diese enthielt eine Mischung aus einem FITC-konjugiertem Ziegenantikörper, der für den F_c-Anteil des Ratten-IgG und einem Phycoerithrin-konjugiertem Ziegenantikörper (Jackson Immunoresearch Labs., West Grove, USA), der für die μ -Kette des Ratten-IgM spezifisch ist. Die Zellsuspensionen wurden gewaschen, in 1%-igem, gepuffertem Formalin fixiert und mittels eines FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) analysiert. Die Verwendung gepaarter, sekundärer Antikörper erlaubte die gleichzeitige Bestimmung von IgG (FITC Kanal) und IgM (PE Kanal).

Die Alloantikörperspiegel wurden als "mode channel fluorescence" und als letzte Verdünnung ausgedrückt, die noch eine Anfärbung größer als 20 Kanäle oberhalb des Kontrollspiegels ergab.

3.10. *In vitro* Untersuchungen

3.10.1 Lymphozyteneinzelsuspension

Um *in vitro* die gemischte Lymphozytenreaktion durchführen zu können, mußten zunächst Einzelsuspensionen aus Lymphknotengewebe hergestellt werden. Nach der Entnahme erfolgte die weitere Aufarbeitung des gewonnenen Lymphknotengewebes in RPMI 1640 Medium (Gibco, Eggenstein), welchem 25mM Hepes-Puffer (Gibco), 2mM L-Glutamin (Gibco), 10%-iges hitze-inaktiviertes foetales Kälberserum und eine 1%-ige Antibiotikalsg., bestehend aus 5000 IE Penicillin und 5000µg Streptomycin/ml (Gibco), zugesetzt waren.

Das Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen zerkleinert, durch ein feines Sieb (Porengröße 0,4 mm) in eine Petrischale passiert, daraufhin aufgenommen und bei 1200 U/min 10 min zentrifugiert sowie resuspendiert. Isoliert wurden die Lymphozyten mittels einer Übersichtung der Suspension mit Histopaque (Sigma Chemie, Deisenhofen) und zwanzigminütiger Zentrifugation bei 2000 U/min.

Nach weiteren Waschvorgängen erfolgte die Aufnahme der Zellsuspensionen in ein komplettes Medium, welches aus RPMI 1640 mit Zusätzen (s.o.) und 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma) bestand. Zum Testen der Zellaktivität kam Erythrosin B (Bio-Rad Lab. GmbH, München) zum Einsatz; die Aktivität lag immer > 90%. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und jeweils die gewünschte Zellkonzentration/ml eingestellt.

3.10.2 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Als eine *in vitro* Abstoßungsreaktion dient die gemischte Lymphozytenreaktion der Messung der Erkennung von körperfremden MHC-Genprodukten durch T-Zellen. Zusätzlich können Voraussagen über eine zellvermittelte Transplantatabstoßung gemacht werden.

Der MLR-Test wurde als Ein-Komponenten-Kultursystem in 96-Loch Mikrokulturplatten mit flachem Boden (Nunc, Wiesbaden) in komplettem Medium durchgeführt. Als Responderzellen (2×10^5 /Loch) dienten Lymphozyten aus Lymphknoten rapamycinbehandelter, cyclosporinbehandelter und unbehandelter sensibilisierter Empfängertiere. Die Stimulatorzellen wurden von BN-Ratten gewonnen und mit dem Cytostatikum Mitomycin (Mitomycin 2 medac, Medac GmbH, Hamburg) behandelt, um diese zu inaktivieren.

Diese Kulturansätze wurden bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre für 3 und 5 Tage inkubiert und 24 h vor dem Ernten mit 1µCi/Loch ³[H]Thymidin (Amersham, Braunschweig) versetzt. Nun wurden die Ansätze mittels eines autom. Zellsammlers (PHD, Dunn, Ansbach), auf Filterpapier aus Glasfieber (Dunn, Ansbach), geerntet. Hiernach erfolgte die Messung nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit (Formula 989, Du Pont, Bad Nauheim) in einem Szintillationszähler (Philips PW 4700, Eindhoven, NL). Als negative Kontrolle diente ein Kulturansatz nur mit Responderzellen, als positive Kontrolle ein vollständiger Kulturansatz unbehandelter sensibilisierter Empfängertiere

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung 4-facher Messungen ausgedrückt. Die suppressive und proliferative Potenz wurde als Stimulationsindex bzw. als Prozentsatz der experimentellen Werte zur positiven Kontrolle ausgedrückt :

Stimulationsindex = ((exp. Wert - neg. Kontrolle)/(pos. Kontrolle- neg.Kontrolle)) x 100{für den Prozentsatz}

3.11. Statistische Analyse

Pro Versuchsgruppe wurde die mittlere Funktionszeit der Herztransplantate in Tagen mit der zugehörigen Standardabweichung berechnet und wird im folgenden als $\bar{x} = n \text{ Tage} \pm n \text{ Tage}$ bezeichnet. Die normalverteilten Untersuchungsergebnisse wurden mit dem Student-T-Test ausgewertet, die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $p=0,05$ als Entscheidungsgrenze gewählt.

Die MLR-Testergebnisse wurden mit dem Fisher-Test auf statistische Signifikanz untersucht, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ galt.

Bei den immunhistologischen Untersuchungen und zur Analyse zirkulierender Antikörper wurden aus den Einzelergebnissen einer Gruppe für jeden Antikörper der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Unabhängig davon erfolgte eine Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen für jeden Antikörper mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben.

3.12. Abkürzungen

APAAP:	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase Färbung
ATG:	Antikörper gegen T-Zellen
ALG:	Antilymphozytenglobulin
APC's:	Antigenpräsentierende Zellen
BN-Ratte:	Brown Norway Ratte
cpm:	counts per minute (Zerfälle pro minute)
CSA:	Cyclosporin A
ECM:	extracelluläres Matrixprotein
FACS:	Flourescence Activated Cell Sorter
FITC:	Flourescein Isothiocyanat
GVHD:	graft versus host disease
HLA:	human lymphocyte antigen
IFN- γ :	Interferon- γ
Ig:	Immunglobulin (Antikörper)
IgG:	Immunglobulin G
IgM:	Immunglobulin M
LBNF ₁ -Ratte:	(Lewis x BN) F ₁ Hybridratte
Lew-Ratte:	Lewis Ratte
Lsg. :	Lösung
MHC:	Major Histocompatibility Complex
MLR:	Mixed Lymocyte Reaction (gemischte Lymphozytenreaktion)
MPL:	Methylprednisolon
PBS:	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlg.)
p.tx.	post transplantationem
RPM:	Rapamycin
Tx. :	Transplantation
ÜZ :	Überlebenszeit des Transplantates

4. Ergebnisse

4.1 Kontrollgruppen

4.1.1 Kontrollgruppe Transplantatüberlebenszeiten

Als Kontrollgruppe für die Transplantatüberlebenszeiten dienten unbehandelte, mit BN-Haut sensibilisierte LEW-Empfängertiere, denen ein entsprechendes BN- Spenderherz transplantiert wurde. Hierbei stießen die Empfängertiere die Transplantate innerhalb von 24-36 Stunden ab ($1,1 \pm 0,2$ Tage, $n=8$).

Diese Kontrollgruppe wurde für sämtliche Versuche zu Transplantatüberlebenszeiten verwendet, d.h. sowohl für die Versuche zur Vorbehandlung mit RPM, als auch für die Versuche zur Vorbehandlung mit CSA.

4.1.2. Kontrollgruppen Immunhistochemische Untersuchung

markierte Zellen	Tag 1	Tag 7
mononucleäre Phagozyten	$318,5 \pm 64,8$	$274,8 \pm 69,9$
MHC-Antigen Klasse 2	$275 \pm 36,23$	$57,13 \pm 16,7$
T-Suppressor-, zytotoxische T-Zellen	$82,27 \pm 24,4$	$94,8 \pm 20,1$
T-Zellen	$29,2 \pm 9,1$	$93,54 \pm 32,5$
Stimulierte T-Zellen	$47,7 \pm 17,8$	$21,4 \pm 7,7$
T-Helferzellen, Makrophagen	$34,9 \pm 10,4$	$40,77 \pm 8,1$
B-Zellen	$74,2 \pm 21,5$	$39,4 \pm 9,3$
Tenascin	< 10 %	50-80 %
IFN- γ	20-50 %	10-20 %
TNF- α	50-80 %	20-50 %
Fibronectin	> 80 %	> 80 %

Tab.1 : Immunhistologisches Zellprofil der Transplantate unbehandelter Spendertiere, wobei ebenfalls bei den Empfängertieren keine immunsuppressive Behandlung stattgefunden hat. Die Transplantate wurden jeweils am Tag 1, sowie am Tag 7 p.tx. untersucht. Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n=2/d$)

Am Tag 1 und Tag 7 p.tx. fällt insgesamt gesehen eine massive Zellinfiltration auf. Es kommt zu einer beträchtlichen Einwanderung von mononucleären Phagozyten in das Gewebe, ebenfalls kann man von einer relativ hohen Expression des MHC Kl. II-Antigen-Komplexes sprechen. Bezüglich der T-Zell-Reihe überwiegen die Zellen, die durch den Marker für zytotoxische- und T-Suppressorzellen angefärbt werden, wobei man bei dieser akzelerierten Form der Abstoßungsreaktion hauptsächlich von der zytotoxischen T-Zellfraktion ausgehen kann. Stimulierte T-Zellen überwiegen im Transplantations- gewebe über *normale* T-Zellen nur am Tag 1 p.tx..

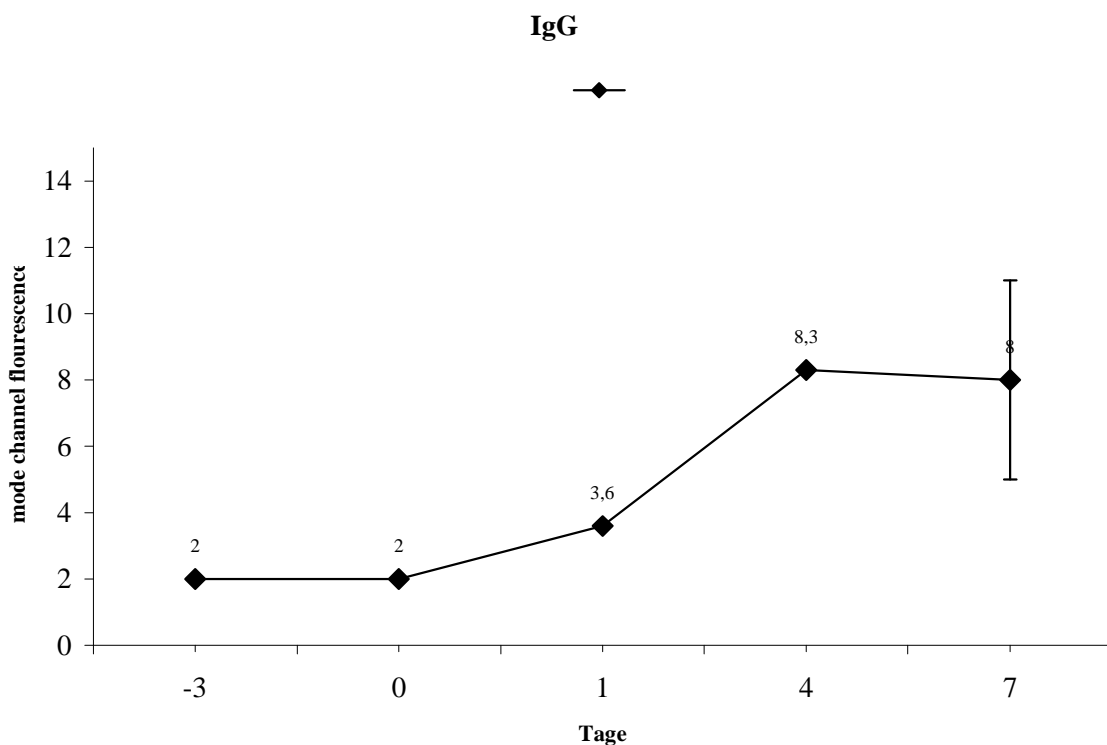
Es kommt weiterhin zu einer Migration von T-Helfer/Inducer-Zellen und Makrophagen in das Gewebe. Es ist als bemerkenswert zu bezeichnen, daß die Fraktion der B-Zellen relativ stark ausgeprägt ist, wobei am Tag 1 p.tx. der Zellgehalt im Gewebe sich massiver darstellt als am Tag 7 p.tx.

Bezüglich der Zytokinausschüttung ist zu sagen, daß sowohl beim Interferon- γ als auch beim Tumor-Nekrose-Faktor- α sich das Gewebe kräftig anfärbt. Hierbei ist festzustellen, daß insgesamt die Zytokinausschüttung am Tag 1 p.tx. stärker ausgeprägt ist als am Tage 7 p.tx.(siehe Tab. 1)

Es ist an beiden Untersuchungstagen eine sehr starke Anfärbung des Fibronectins zu registrieren. Bezüglich des Tenascins ist am Tag 1 p.tx. von einer geringen Gewebsreaktion zu sprechen, während diese am Tag 7 p.tx. als deutlich ausgeprägter zu bezeichnen ist.

4.1.3 Kontrollgruppe zur Analyse zirkulierender Antikörper

(A)



(B)

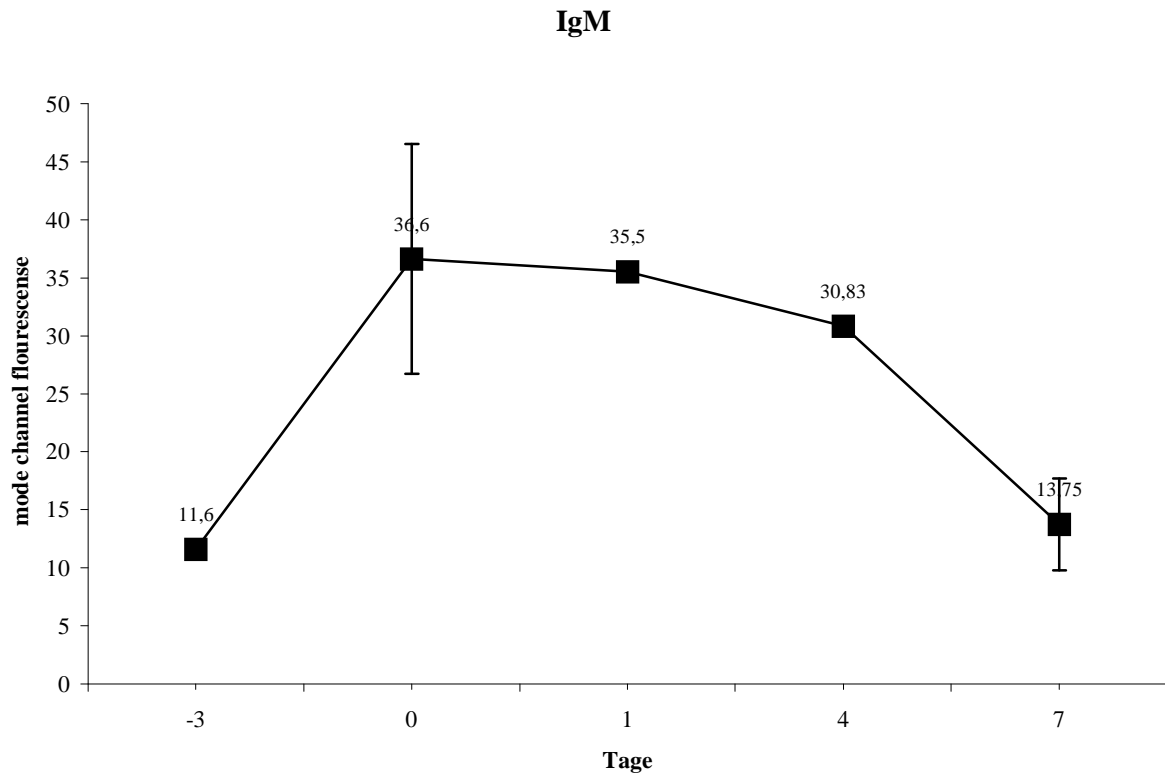


Abb. 2: Flowzytometrische Messung der zirkulierenden IgM- (A) und IgG-(B) Alloantikörper in unbehandelten, sensibilisierten Empfängertieren. Jeder Punkt stellt die "mode channel Fluorescence" bei einer Serumverdünnung von 1:4-1:128 dar (vgl. Materialien und Methoden 3.9.3) [3-4 Messungen pro Gruppe / n= 4/d]

Die Seren der Empfängertiere wurden wie bereits beschrieben (3.9.3) an den Tagen -3,0,1,4,7 auf donorspezifische IgM- und IgG- Alloantikörper untersucht. Bezüglich der IgM-Produktion auf den Transplantationsreiz innerhalb der Sensibilisierungsphase (Hauttransplantation) ist zu bemerken, daß der Empfängerorganismus, wie zu erwarten, bereits am Tage -3 mit einer erheblichen Antikörperproduktion zu reagieren scheint, die sich bis zum Transplantationstag (Tag 0) noch sehr verstärkt. Vom Tag 0 an fällt die IgM -Antwort wieder stetig ab, um aber an den folgenden Untersuchungstagen jeweils über dem Ausgangswert zu persistieren.

Die IgG-Antwort bleibt, ebenfalls wie zu erwarten, zunächst auf relativ niedrigen Niveau; erst am Tag 1, dem Tag der tatsächlichen Abstoßung, beginnt die Umstellung auf eine IgG-Antwort der Empfängertiere. An den Tagen 4 und 7 p.tx. kann man von einer ausgeprägten IgG-Antwort der Empfängerorganismen sprechen. Da am Tag 1 p.tx. die IgM.-Antwort bereits wieder rückläufig erscheint, während ab diesem Tag die IgG-Antwort stetig zunimmt, kann man ab diesem Tag von einem vollzogenen Antikörper-, „shift“ sprechen

4.2. Spendervorbehandlung mit Cyclosporin A

4.2.1. Transplantatüberlebenszeiten

4.2.1.1. Donorvorbehandlung mit Cyclosporin A und Akzeptorbehandlung mit Rapamycin

Wurden die Ratten nach Protokoll 3.8.1 behandelt, waren die transplantierten Herzen nach $2,55 \pm 0,74$ Tagen abgestoßen ($n=9$, $p < 0,001$).

4.2.1.2. Donorvorbehandlung mit Cyclosporin A ohne Akzeptorbehandlung

Bei dieser Versuchsgruppe entfiel eine Behandlung der transplantierten Ratten (Protokoll 3.8.2) ab dem Transplantationstag. Es wurden alle Herztransplantate bereits am Tag 1 ± 0 post transplantationem abgestoßen ($n=6$).

Im Vergleich dieser beiden Versuchsgruppen ist zunächst bzgl. der Transplantatüberlebenszeiten festzustellen, daß die Transplantate der Gruppe mit Empfängerbehandlung mit Rapamycin länger schlugen (2,55 Tage) als die Transplantate der Gruppe ohne Empfängerbehandlung (1 Tag) sowie der Kontrollgruppe (1,1 Tage). Die Transplantatüberlebenszeiten der Gruppe ohne Empfängerbehandlung nähern sich denen der Kontrollgruppe gänzlich unbehandelt sensibilisierter Tiere an (1,1 Tage).

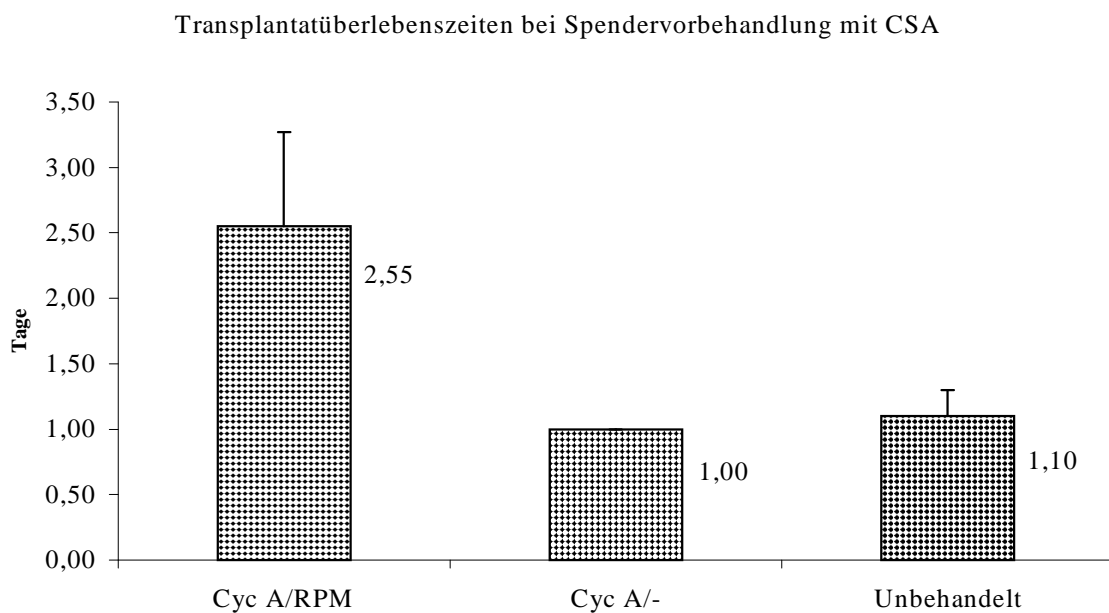


Abb. 3 : Darstellung der Transplantatüberlebenszeiten bei einer Spendervorbehandlung mit CSA. Dargestellt sind die Überlebenszeiten bei Vorbehandlung mit CSA und Empfängerbehandlung mit RPM sowie ohne jegliche Empfängerbehandlung im Kontrast zur Kontrollgruppe unbehandelt abstoßender Tiere.

4.2.2 *Immunhistochemische Untersuchung*

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte am Tag 1 p.tx. sowie am Tag 7 p.tx. Zur Auswertung wurde vorgegangen wie unter 3.9.2 beschrieben. Als Positivkontrolle dienten akzeleriert abstoßende, unbehandelte Empfängertiere, deren Transplantate ebenfalls am Tag 3/Tag 7 p.tx. nach gleicher Methodik untersucht wurden. Ebenso wurde bei den Tieren der Negativkontrolle vorgegangen.

4.2.2.1 Donorvorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit RPM

markierte Zellen	Tag 1	Tag 7
mononucleäre Phagozyten	73,76±0,62	81±,3
MHC-Antigen Klasse 2	68,5±0,32	61±10,8
T-Suppressor-, zytotoxische T-zellen	22,68±4	22,8±3,25
T-Zellen	16,6±1,4	5±3,6
stimulierte T-Zellen	21,4±1,65	3,93 ±1,23
T-Helferzellen, Makrophagen	19,9±1,55	16,56±14,6
B-Zellen	16,3±1,75	29,73±2,65
Tenascin	20-50 %	10-20%
IFN- γ	<10 %	<10 %
TNF- α	10-20 %	10-20%
Fibronectin	>80 %	50-80%

Tab.2 : Immunhistologisches Zellprofil der Herzen von Tieren, die ein mit CSA vorbehandeltes Transplantat erhalten haben. Ab Transplantationstag erhielten die Tiere eine Medikation mit RPM. Untersuchung an den Tagen 1/ 7 p.tx.. Mittelwerte ± Standartabweichungen (n=2/d)

Sowohl am Tag 1 als auch am Tag 7 p.tx. ist die Infiltration des Gewebes mit mononucleären Phagozyten nicht sehr stark ausgeprägt, wohl aber deutlich vorhanden. Gleiches läßt sich über die Expression des MHC-Klasse 2-Komplexes sagen. In beiden Fällen ergeben sich vergleichbar hohe Werte an beiden Untersuchungstagen. Im Gegensatz zur Kontrolle ist auch die gesamte T-Zellantwort als supprimiert zu bezeichnen. Bzgl. der Fraktion der zytotoxischen- und T-

Suppressor Zellen ist die Antwort des Organismus hier ungefähr um das vierfache vermindert; bei den stimulierten T-Zellen sowie T-Helfer-, Inducer-Zellen und Makrophagen kann man von einer Suppression um die Hälfte sprechen. Die Zellantwort ist bei der gesamten T-Zellfraktion am Tag 1 p.tx. ausgeprägter als am Tag 7 p.tx.

Auch die B-Zell-Antwort des Organismus ist in dieser Untersuchung nicht so stark ausgeprägt vorhanden wie bei der Kontrolluntersuchung. Dies betrifft vor allem den Tag 1 p.tx., während zum späteren Zeitpunkt innerhalb der Abstoßungsreaktion die Zellinfiltration nicht mehr so deutlich differiert. Die Zytokinausschüttung ist insgesamt ebenfalls supprimiert. Besonders deutlich betrifft dies an beiden Untersuchungstagen das Interferon- γ . Aber auch beim TNF- α kann man höhergradige Diskrepanzen in der Gewebeanfärbung zur Kontrolle wahrnehmen. Das Glykoprotein Fibronectin läßt sich auch bei dieser Untersuchungsgruppe an beiden Untersuchungstagen stark anfärben, insofern kann man von keiner Diskrepanz zur Kontrolle sprechen. Tenascin läßt sich nur am Tag 1 p.tx. höhergradig nachweisen, bereits am Tag 7 p.tx. ist die Reaktion dezent ausgeprägt.

4.2.2.2 Donorvorbehandlung mit CSA ohne Akzeptorbehandlung

markierte Zellen	Tag 1	Tag 7
mononucleäre Phagozyten	64,67 \pm 25,7	40,83 \pm 9,5
MHC-Antigen Klasse 2	64,1 \pm 33	27,4 \pm 12,6
T-Suppressor-, zytotoxische T-Zellen	23,03 \pm 10,8	13,4 \pm 4,4
T-Zellen	11,13 \pm 3,4	4,8 \pm 4,5
stimulierte T-Zellen	14,8 \pm 2	9,8 \pm 8,93
T-Helferzellen, Makrophagen	11,5 \pm 2,7	4,5 \pm 2,3
B-Zellen	9,4 \pm 8	14,83 \pm 6,2
Tenascin	10-20 %	20-50 %
IFN- γ	< 10 %	10-20 %
TNF- α	10-20 %	20-50 %
Fibronectin	> 80 %	50-80 %

Tab.3 : Immunhistologisches Zellprofil mit CSA vorbehandelter Transplantate von Tieren ohne jegliche Empfängerbehandlung. Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=2/d).

Bei dieser Versuchsgruppe kommt es an den Tagen 1 und 7 p.tx. zu einer geringen Infiltration von mononucleären Phagozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls wird weniger Klasse II MHC-Antigen exprimiert, wobei sich der Wert am Tag 7 p.tx. ca 2,3 fach niedriger darstellt als am Tag 1.

Die T-Zellreihe weist zur Kontrolle eine vergleichbar niedrigere Migrationsrate auf. Dies betrifft alle untersuchten Fraktionen. Innerhalb der T-Zellreihe dominieren zahlenmäßig die zytotoxischen T-Zellen über die stimulierten T-Zellen gefolgt von der Fraktion T-Helfer / Inducer-Zellen / Makrophagen. Zur B-Zellreihe lässt sich vergleichbares feststellen. Hier liegt das Maximum am Tag 7 p.tx. Durchschnittlich ist die Gesamtzellzahl am Tag 1 p.tx. höher als am Tag 7 p.tx..

Es kommt am Tag 1 und 7 p.tx. zu einer schwachen IFN- γ Ausschüttung, die Gewebeanfärbung für TNF- α liegt um ca. 10% darüber am Tag 1, wobei am Tag 7 p.tx. die TNF- α Produktion am höchsten ist. Tenascin färbt sich am Tag 1 stärker an als bei der Kontrolle, jedoch nicht am Tag 7 p.tx. Fibronectin lässt sich an beiden Untersuchungstagen in einer ausgeprägten Reaktion auf die Antikörper nachweisen, insofern bestehen kaum Unterschiede zur Kontrolluntersuchung.

4.2.3 *Flowzytometrische Analyse (Bestimmung zirkulierender Antikörper)*

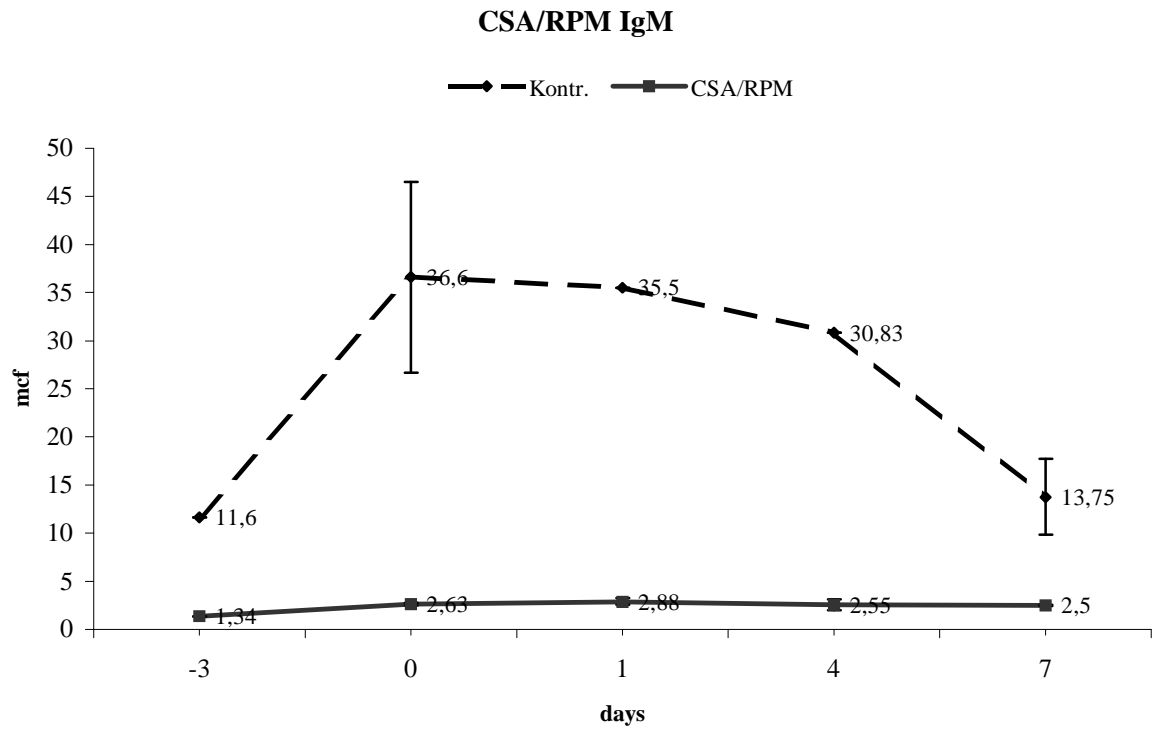
Es fand eine Untersuchung der Seren der Akzeptortiere auf donorspezifische Antikörper an den Tagen -3, 0 (Tag der Transplantation), 1, 4 und 7 statt. Es wurden Antikörper vom Typ IgM und IgG detektiert.

4.2.3.1 Donorvorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit RPM

IgM: Es zeigte sich eine stetige Zunahme der Alloantikörperproduktion bis zum Transplantationstag und darüber hinaus. Der höchste Wert wurde am Tag 1 gemessen, daraufhin fiel der Wert der Antikörperproduktion an den Tagen 4 und 7 wieder leicht ab. Die IgM-Titer liegen deutlich unter denen der Kontrolltiere.

IgG: Bei den IgG Alloantikörpern kam es zu einer starken Zunahme der Titer in der Zeit von Tag -3 bis zum Tag 0, an dem sich der höchste Wert fand. In den darauffolgenden Tagen kam es zu keiner nennenswerten Erniedrigung des Antikörpertiters. Die IgG-Titer übersteigen nur am Tag 0 die der Kontrolltiere, verbleiben an den übrigen Versuchstagen jedoch unterhalb denen der Kontrolltiere.

(A)



(B)

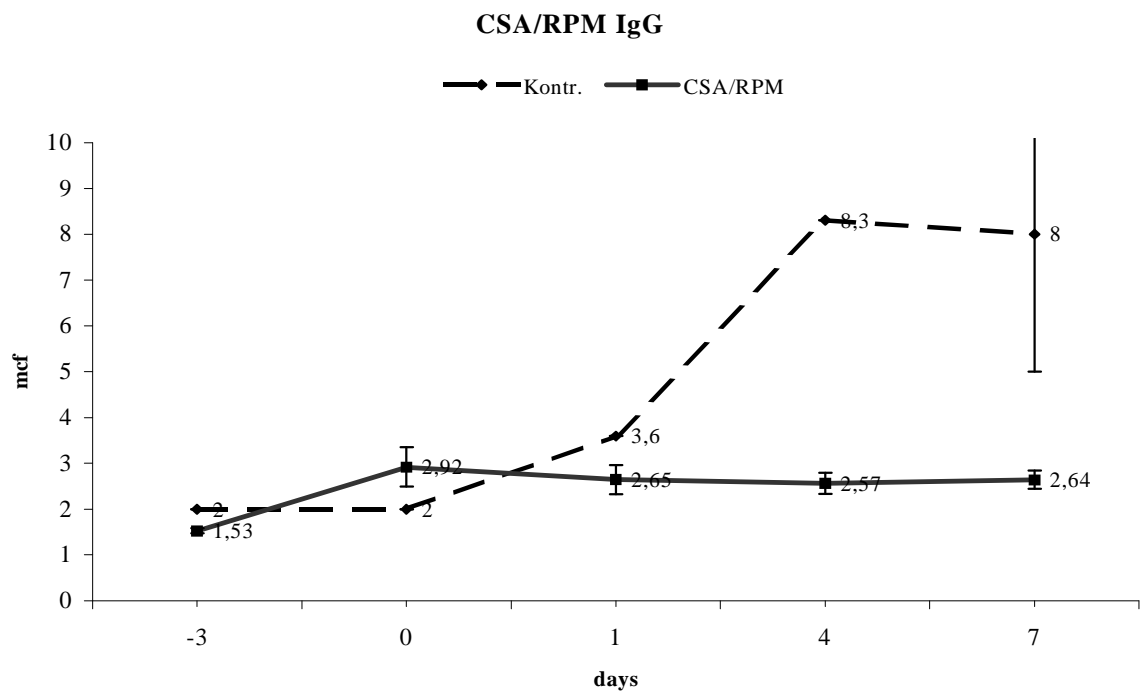


Abb.4 : Flowzytometrische Messung der zirkulierenden IgM-(A) und IgG-(B) Alloantikörper in unbehandelten und nach Protokoll 3.8.1 behandelten ,sensibilisierten Empfänger-tieren. Jeder Punkt stellt die mode channel flourescence bei einer Verdünnung von 1 : 4- 1- 128 dar (n= 3-4 Messungen/Gruppe)

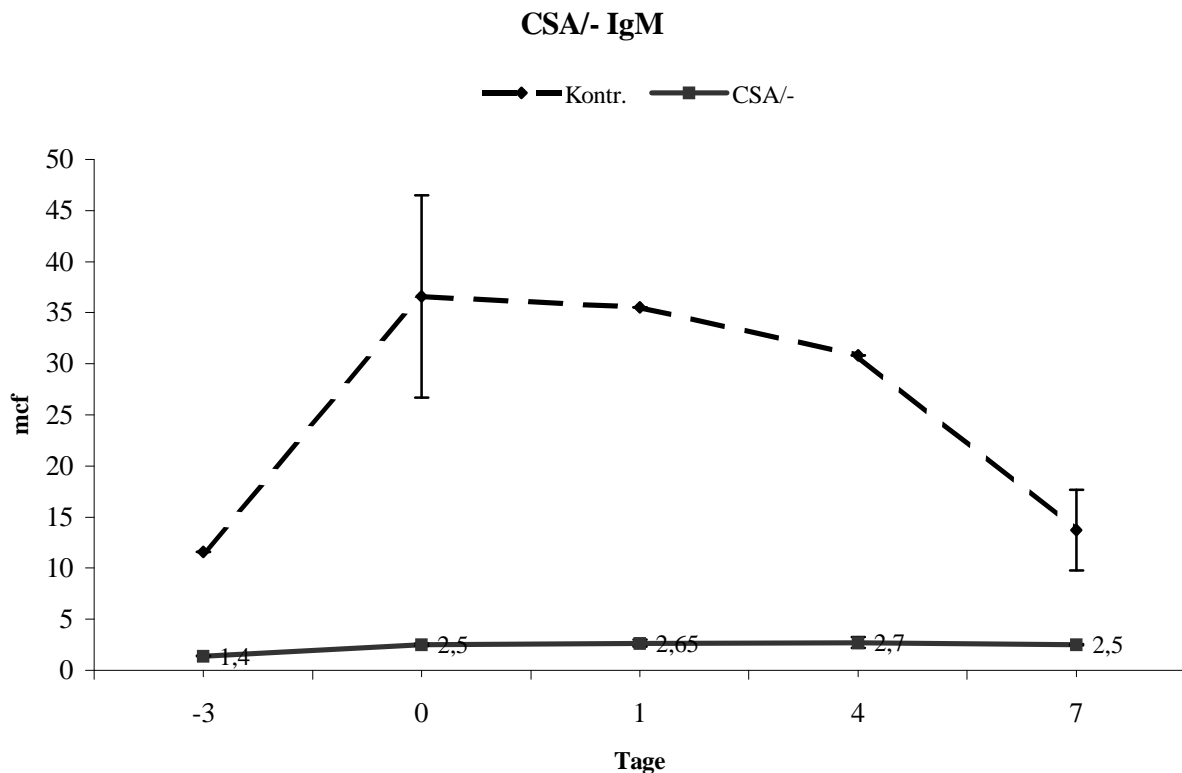
4.2.3.2 Donorvorbehandlung mit CSA ohne Akzeptorbehandlung

IgM: Vom Tag der Hauttransplantation(Sensibilisierung) erfolgte eine Zunahme der IgM-Alloantikörperbildung, die bis zum Tag 0 sprunghaft anstieg um ihren höchsten Wert am Tag 1 p.tx. zu finden. An den folgenden Messtagen (Tag 4/7) fiel der Antikörpertiter wieder leicht ab.

IgG: Der IgG Alloantikörpertiter nahm vom Tag -3 bis zum Tag 4 p.tx. kontinuierlich zu und erreichte am Tag 4 einem höheren Wert als der höchste IgM Titer. Am Tag 7 p.tx. war der Alloantikörpertiter noch nicht stark gefallen.

Die Alloantikörperantwort der Tiere dieser Versuchsgruppe fällt insgesamt gesehen deutlich supprimiert aus, im Gegensatz zur Versuchsgruppe der Kontrolle.

(A)



(B)

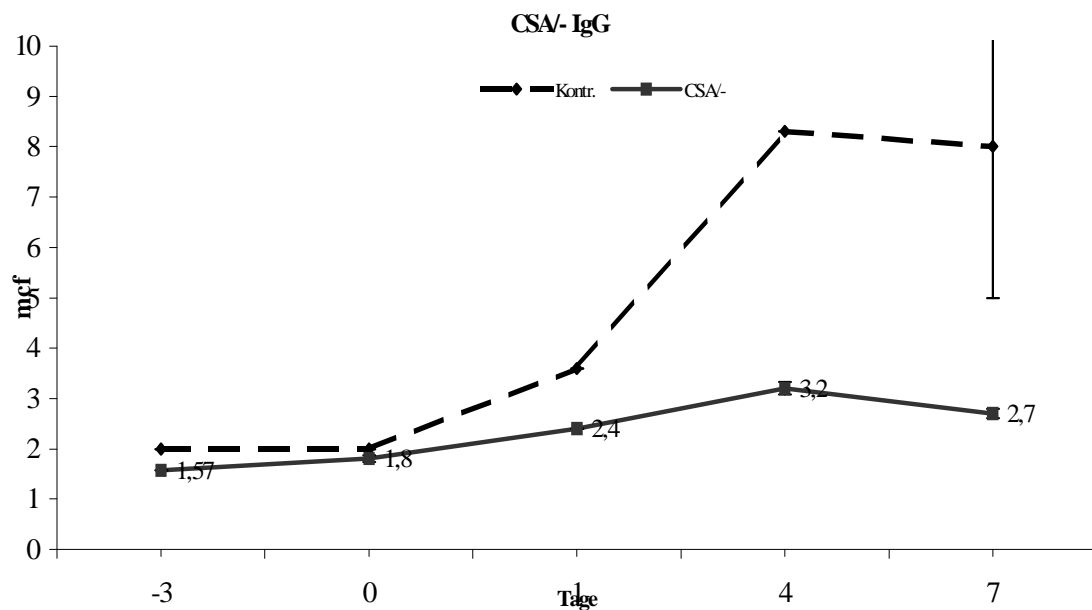


Abb. 5 : Flowzytometrische Messung der zirkulierenden IgM-(A) und IgG-(B) Alloantikörper in unbehandelten und nach Protokoll 3.8.2 behandelten, sensibilisierten Empfängertieren. Jeder Punkt stellt die mode channel Flourescence bei einer Serumverdünnung von 1:4-1:128 dar (n=3-4 Messungen /Gruppe).

4.2.4. Gemischte Lymphozytenreaktion

Die Stimulationsindizes wurden wie oben beschrieben, jeweils nach 3 Kulturtagen , sowie nach 5 Kulturtagen bestimmt.

Als Bezugswert diente ein nur aus LEW-Responderzellen und BN-Stimulatorzellen bestehender Ansatz, dessen Counts gleich 100%, bzw. als Stimulationsindex gleich 1 gesetzt wurde.

Bei den mit CSA (Donor) und RPM (Akzeptor) behandelten Ratten stellten sich die Stimulationsindizes wie folgt dar:

3.Tag : $1,55 \pm 0,25$ (n= 3) / 155%

5.Tag : $0,98 \pm 0,52$ (n=3) / 98%

Offenbar kommt es in dieser Versuchsgruppe zu einer schwachen stimulierenden Wirkung der Zellen auf das spenderspezifische Antigen durch die Responderzellen der therapierten Empfängertiere am Tag 3 ($1,55 \pm 0,25$), während man das Ergebnis am Tag 5 ($0,98 \pm 0,52$) als eine sehr leichte Suppression beschreiben kann.

4.3. Donorvorbehandlung mit Rapamycin

4.3.1 Transplantatüberlebenszeiten

4.3.1.1 Donorvorbehandlung mit Rapamycin und Akzeptorbehandlung mit Rapamycin

Die Behandlung der Spender und Empfängertiere fand wie in Protokoll 3.8.3 beschrieben statt. In dieser Versuchsgruppe wurden die Herzallotransplantate nach 2 ± 1 Tagen von den Akzeptortieren abgestoßen ($n=9$, $p < 0,05$)

4.3.1.2 Donorvorbehandlung mit Rapamycin ohne Akzeptorbehandlung

Hierbei wurden die Versuchstiere nach Protokoll 3.8.4 behandelt.

Die nicht behandelten Akzeptortiere stießen in dieser Versuchsgruppe die Transplantate der mit RPM behandelten Donortiere innerhalb von $1,14 \pm 0,38$ Tagen ab ($n=7$)

Dieser Wert nähert sich dem der Kontrollgruppe (4.1.1.) unbehandelt abstoßender Tiere an.

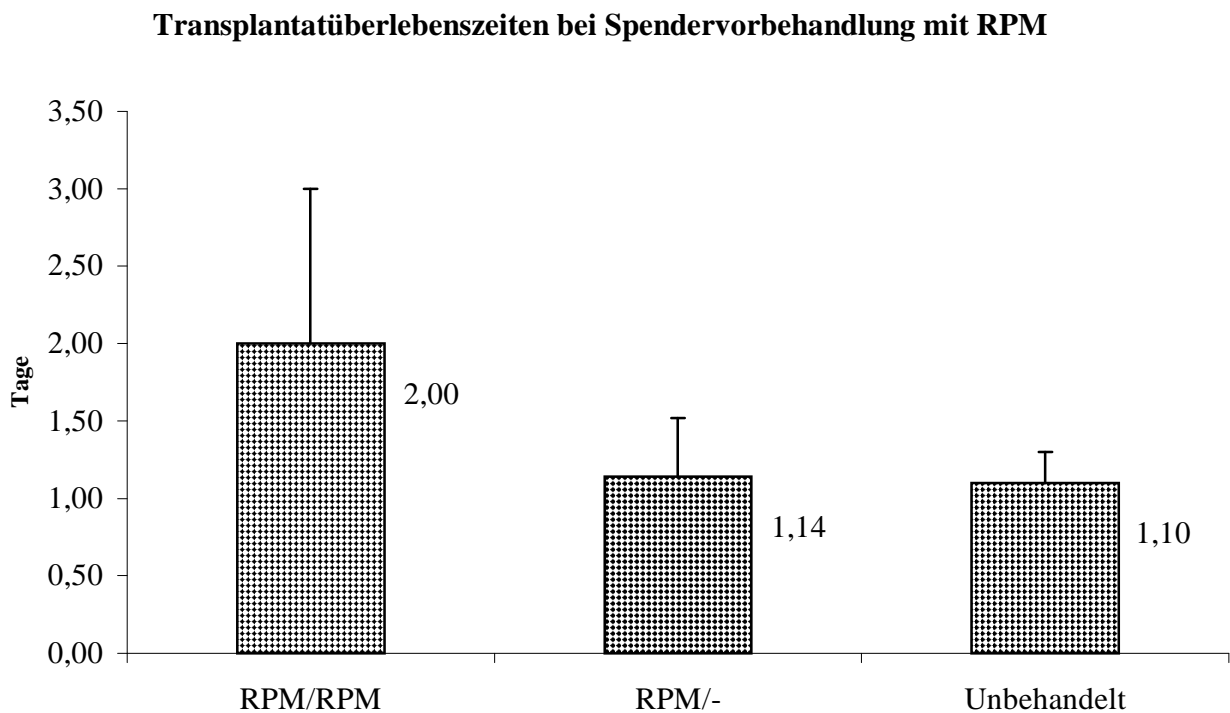


Abb. 6 : Darstellung der Transplantatüberlebenszeiten bei einer Spendervorbehandlung mit RPM.

Dargestellt sind die Überlebenszeiten bei Vorbehandlung mit RPM und Empfängerbehandlung mit RPM, sowie ohne Empfängerbehandlung, im Kontrast zur Kontrollgruppe unbehandelt abstoßender Tiere.

4.3.2 Immunhistochemische Untersuchung

Wie unter 4.2.2. beschrieben fand auch bei dieser Versuchsgruppe eine immunhistochemische Untersuchung der Transplantate am Tag 1 p.tx. sowie am Tag 7 p.tx. statt. Bzgl. der Kontrollgruppen wurde in gleicher Weise vorgegangen.

4.3.2.1 Donorvorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit RPM

markierte Zellen	Tag 1	Tag 7
mononucleäre Phagozyten	103,5±11,25	160,4±17,35
MHC-Antigen Klasse 2	91,5±14,7	138,53±2,5
T-Suppressor-, zytotoxische T-Zellen	36,6±0,5	18,5±9,9
T-Zellen	7,4±3,8	3,5±2,5
stimulierte T-Zellen	30,98±6,6	8±7,8
T-Helferzellen, Makrophagen	24,03±9,3	20,6±18,6
B-Zellen	23,6±6,83	16,5±7,8
Teanscin	<10 %	10-20 %
IFN- γ	<10 %	<10 %
TNF- α	10-20 %	10-20 %
Fibronectin	>50 %	50-80 %

Tab.4 : Immunhistologisches Zellprofil der Herzen von Tieren mit einer Spendervorbehandlung mit RPM sowie einer Empfängerbehandlung mit RPM.

Untersuchung am Tage 1 / 7 p.tx.. Mittelwerte \pm Standartabweichungen (n=2/d).

Die Gewebeeinfiltration der mononucleären Phagozyten ist insgesamt als hoch zu bezeichnen, jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe unbehandelter Tiere als deutlich niedriger zu werten.

Hierbei kommt es zur zahlenmäßig höheren Zellinfiltration am Tag 7 p.tx..

Auch bei der Expression von Klasse II MHC-Antigen ist vergleichbares festzustellen, wobei am Tag 7 p.tx. die Expression überwiegt.

Die Transplantate weisen eine im Vergleich zu denen von unbehandelten Tieren niedrigere Infiltration von Zellen der T-Zellreihe auf. Hierbei fällt ebenfalls ein zahlenmäßiges Überwiegen der Fraktion zytotoxischer-/T-Suppressorzellen auf, gefolgt von der Fraktion stimulierter T-Zellen, sowie der Fraktion T-Helfer/Inducerzellen/Makrophagen.

Die B-Zellantwort ist im Kontrast zur Kontrolle supprimiert, die B-Zellantwort am Tag 1 p.tx.

fällt geringfügig ausgeprägter aus als am Tag 7 p.tx..

Die Zytokinausschüttung ist an beiden Untersuchungstagen auf gleichem Niveau, sowohl für IFN- γ als auch für TNF- α auf einem eher niedrigem. Hierbei ist zu bemerken, daß die TNF- α Produktion um 10% höher liegt als jene von IFN- γ .

Die Zytokinausschüttung der Kontrollgruppe befindet sich an beiden Untersuchungstagen auf deutlich höherem Niveau.

Tenascin läßt sich an beiden Untersuchungstagen kaum nachweisen, der Nachweis des Fibronectins gelingt demgegenüber eher ausgesprochen gut.

4.3.2.2. Donorvorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung

m a r k i e r t e Z e l l e n	T a g 1	T a g 7
m o n o n u c l e ä r e P h a g o z y t e n	234,2 \pm 35,7	171,33 \pm 29,6
M H C - A n t i g e n K l a s s e 2	165,8 \pm 27,81	130,8 \pm 65,05
T - S u p r e s s o r - , z y t o t o x i s c h e T - Z e l l e n	45,2 \pm 12,27	62,3 \pm 42,3
T - Z e l l e n	13,13 \pm 3,25	45,5 \pm 38,4
s t i m u l i e r t e T - Z e l l e n	16,36 \pm 5,01	14,8 \pm 6,2
T - H e l f e r z e l l e n , M a k r o p h a g e n	29,46 \pm 10,17	18,07 \pm 10,9
B - Z e l l e n	14,22 \pm 5,7	17,6 \pm 11,3
T e a n s c i n	< 10 %	10-20 %
I F N - γ	< 10 %	< 10 %
T N F - α	10-20 %	10-20 %
F i b r o n e c t i n	> 80 %	> 80 %

Tab. 5 : Immunhistologisches Zellprofil der Transplantate von Tieren die eine Donorvorbehandlung mit RPM bekamen, wobei bei den Empfängertiere keine weitere Behandlung stattfand.
Untersuchung jeweils am Tage 1 / 7 p.tx.. Mittelwerte \pm Standartabweichungen (n=2/d).

Bei dieser Versuchsgruppe ist eine vergleichsweise hohe Gewebeeinfiltration mit mononucleären Phagozyten zu vermerken, der höchste Wert fällt am Tag 1 p.tx. auf. Diese Zellzahlen sind höher als bei den Versuchen mit einer zusätzlichen Empfängerbehandlung mit RPM , allerdings erreichen sie nicht die Werte der unbehandelten Kontrolle.

Es läßt sich ähnliches über die Expression des MHC Kl. II -Komplexes feststellen.

Bzgl. der T-Zell-Reihen lassen sich, im Gegensatz zur Kontrolle, niedrigere Zellzahlen finden, jedoch im Vergleich zur Versuchsgruppe mit Empfängerbehandlung, eindeutig höhere.

Innerhalb der T-Zellreihe finden sich, die schon in den anderen Untersuchungen beschriebenen, Verhältnisse.

Auch zur B-Zell-Infiltration läßt wieder vergleichbares feststellen.

Es finden sich in dieser Untersuchung kaum bis mäßig hohe Anfärbungen für IFN- γ und TNF- α , sowie für das detectierte Tenascin .

Einzig die Anfärbung für das Fibronectin ist als sehr kräftig zu bezeichnen.

4.3.3 Flowzytometrische Analyse zirkulierender Antikörper

Die zirkulierenden Antikörper wurden in den Empfängertieren bestimmt am Tag -3 (vor der Herzallotransplantation am Tage der sensibilisierenden Hauttransplantation) am Tag 0 (Transplantationstag) an den Tagen 1 p.tx., 4 p.tx., sowie am Tag 7 p.tx..

4.3.3.1 Donorvorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit RPM

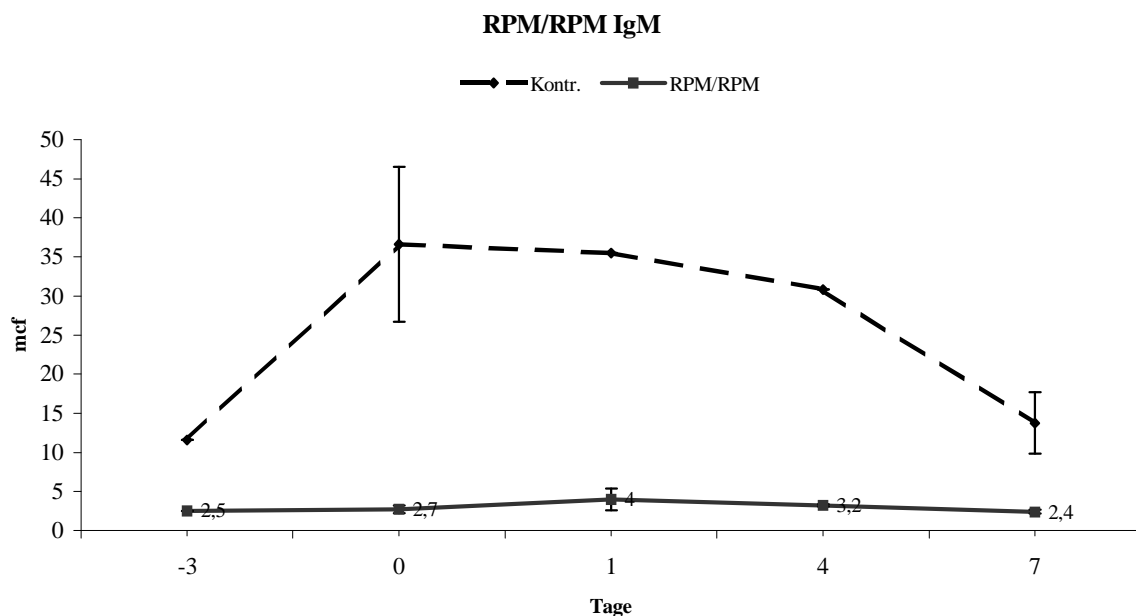
IgM: Die IgM-Allokörperproduktion beginnt auf einem relativ niedrigem Niveau am Tag -3 und steigt bis zum Tag 1 p.tx. auf den höchsten Wert an, erniedrigt sich dann aber wieder zum Tag 4 hin und findet Ihren zweitniedrigsten Wert am Tag 7 p.tx.

Auffällig ist hierbei die insgesamt höhere IgM -Anikörperantwort als bei den Experimenten mit CSA.

IgG: Bei der IgG-Antwort kommt es nicht zu so hohen Titern wie bei der IgM-Antwort, auch erreicht die IgG-Antwort erst Ihren Höhepunkt am Tag 4 p.tx.. Bis zum Tag 7 p.tx. fällt der Titer nur leicht ab.

Es fallen die insgesamt zur Kontrolle deutlich supprimierten Alloantikörpertiter der IgM-, als auch der IgG- Antwort auf.

(A)



(B)

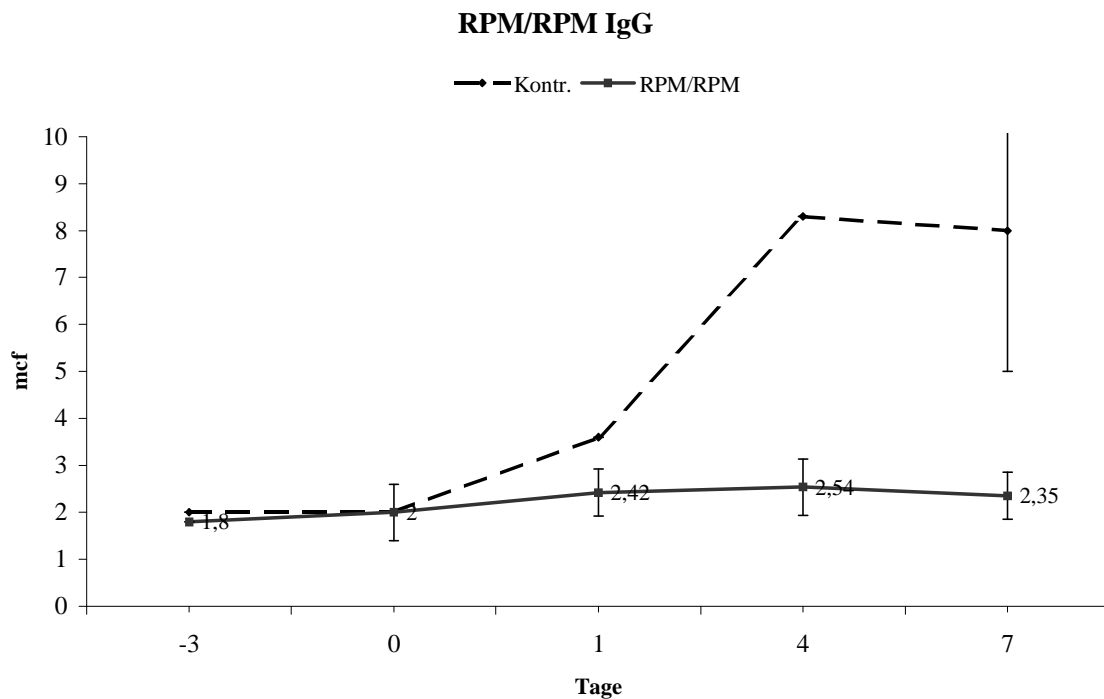


Abb. 7 : Flowzytometrische Messung der zirkulierenden IgM-(A) und IgG-(B) Alloantikörper in unbehandelten und nach Protokoll 3.8.3. behandelten, sensibilisierten Empfängertieren. Jeder Punkt stellt die mode channel fluorescence bei einer Serumverdünnung von 1:4-1:128 dar (n=3-4 Messungen / Gruppe)

4.3.3.2 Donorvorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung

IgM: Bei diesem Experiment erreicht die IgM-Alloantikörperantwort bereits am Tag 0 den höchsten Wert. An den darauffolgenden Meßtagen fällt die IgM-Produktion wieder leicht ab. Die insgesamt gemessenen Werte sind höher als die bei der Versuchsgruppe mit Akzeptorbehandlung gemessenen.

Die IgM- Antikörperantwort ist deutlich supprimierter als jene der Kontrolltiere.

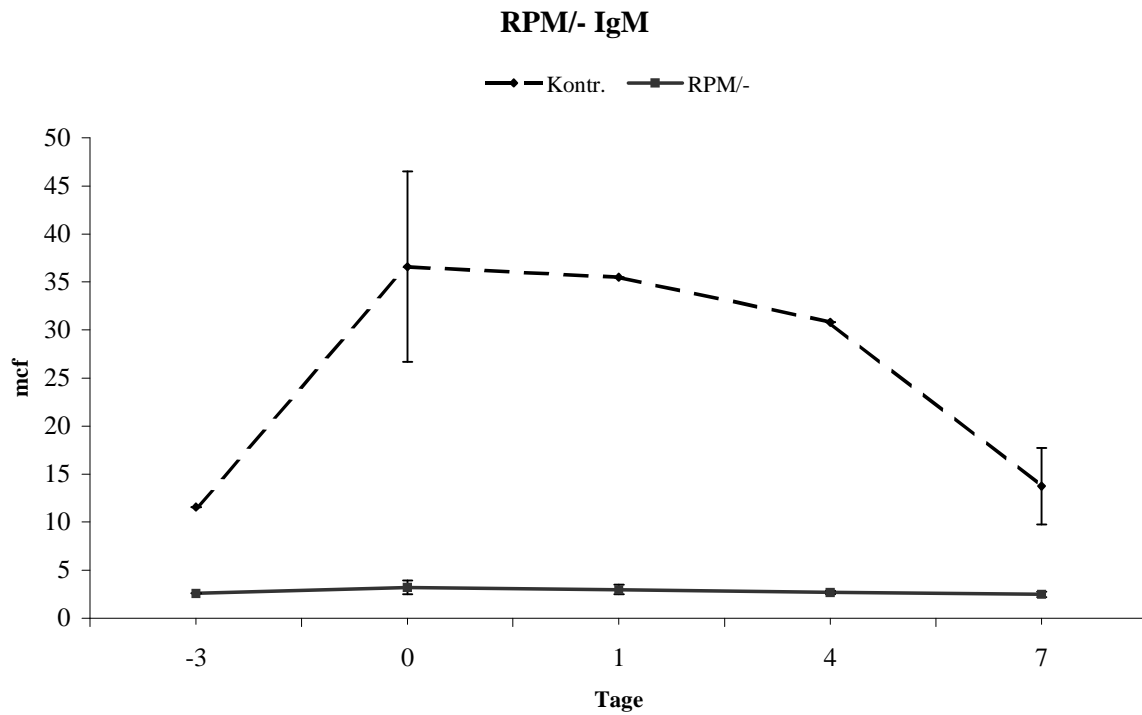
IgG: Hier stellt sich ein Verlauf dar, bei dem der höchste Wert wiederum am Tag 1 p.tx. gemessen wurde, nach einem kontinuierlichen Anstieg über die Tage 0 und -3.

An den Tagen 4 und 7 p.tx. kommt es zu einer leichten Senkung der IgG-Produktion.

Insgesamt wurden auch hier höhere Werte gemessen als in der Gruppe mit Empfängerbehandlung.

Die IgG- Antikörpertiter fallen auch in dieser Versuchsgruppe niedriger aus als in der Kontrollgruppe.

(A)



(B)

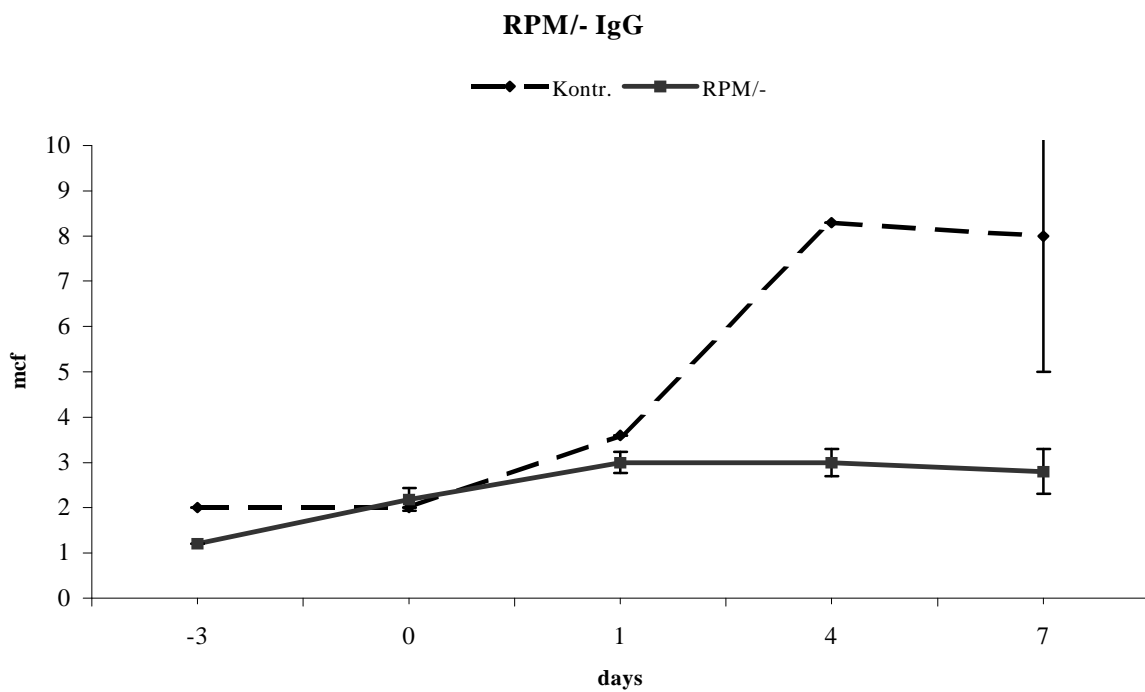


Abb. 8 : Flowzytometrische Messung der zirkulierenden IgM-(A) und IgG-(B) Alloantikörper in unbehandelten und nach Protokoll 3.8.4. behandelten, sensibilisierten Empfängertieren .Jeder Punkt stellt die Mode Channel Flourescence bei einer Serumverdünnung von 1.4-1:128 dar (n=3-4 Messungen/Gruppe).

4.3.4 Gemischte Lymphozytenreaktion

Bei dieser Versuchsgruppe kam es zu einer starken Proliferation auf das spenderspezifische Antigen durch die Responderzellen, welche von Rapamycin behandelten Tieren (nach 3.10.2) an den Tagen 3 und 5 geerntet wurden.

Die relative Immunantwort (als Stimulationsindex angegeben) lag am Tag 3 bei $2,15 \pm 1,02$ (n=4) bzw. bei $2,06 \pm 0,43$ (n=3) am Tag 5.

Diesen Werten ist ein Stimulationsindex von 1 / 100% bei unbehandelten, akzeleriert abstoßenden Tieren gegenüberzustellen.

Tag 3: $2,15 \pm 1,02$ (n=4) / 215%

Tag 5: $2,06 \pm 0,43$ (n=3) / 206%

5. Diskussion

Im einem standartisierten akzelerierten Abstoßungsmodell der herterotopen Herzallotransplantation bei Ratten wurde die Wirksamkeit einer medikamentösen Spendervorbehandlung mit den bereits etablierten immunsuppressiven Substanzen Cyclosporin A und Rapamycin untersucht.

5.1. Spendervorbehandlung mit Cyclosporin A

5.1.1. Bestimmung der Transplantatüberlebenszeiten :

Wurden die Spendertiere mit Cyclosporin vorbehandelt und die Empfängertiere ab dem Transplantationstag mit Rapamycin behandelt (Effektorphase), so konnte eine durchschnittliche Transplantatüberlebenszeit von $2,55 \pm 0,74$ Tagen beobachtet werden. Akzeleriert unbehandelt abstoßende Tiere stießen die Transplantate nach $1,1 \pm 0,2$ Tagen ab. Wurden ausschließlich die Spendertiere mit Cyclosporin ohne Akzeptorbehandlung vorbehandelt, kam es innerhalb von 24 Stunden zur Transplantatabstoßung.

Diesen Ergebnissen sind die Beobachtungen von Schmidbauer et al. hinzuzufügen, in denen eine alleinige Behandlung der Empfängertiere in der Effektorphase mit Rapamycin als uneffektiv zu bezeichnen ist (120). Bei diesem Therapieregime wurden die Transplantate ebenfalls innerhalb der ersten 24 Stunden abgestoßen.

Grundsätzlich läßt sich feststellen, daß eine alleinige Spendervorbehandlung mit Cyclosporin sowie eine alleinige Behandlung der Empfängertiere in der Effektorphase mit Rapamycin keine nennenswerte Verbesserung der Transplantatüberlebenszeit gegenüber der Kontrolle unbehandelt abstoßender Tiere bewirkt. Demgegenüber ist aber die Kombination dieser beiden Therapieregimes, also eine Spendervorbehandlung mit Cyclosporin inklusive

Empfängerbehandlung in der Effektorphase mit Rapamycin, durchaus als erfolgreich zu bezeichnen. Es kam unter diesem Therapieregime zu einer 2,5- fachen Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit.

Ein ähnliches Ergebnis konnten Schmidbauer et al. ebenfalls in einem akzeleriertem Abstoßungsmodell bei Ratten feststellen. Wurden die Spender mit Methylprednisolon (MPL) vorbehandelt und dann der Empfänger mit RPM in der Effektorphase behandelt, so kam es zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit auf 36 ± 11 Tage. Eine alleinige Behandlung des Spenders mit MPL ohne Akzeptorbehandlung ergab immerhin noch eine Transplantatüberlebenszeit von $2,4 \pm 1$ Tagen (91).

Diese positive Auswirkung einer alleinigen Spendervorbehandlung bei MPL konnte in dieser Studie für CSA anhand der Transplantatüberlebenszeiten nicht verifiziert werden. Der positive Effekt einer Kombinationsbehandlung, die sowohl den Spender als auch den Empfänger betrifft, konnte in dieser Studie ebenfalls dargestellt werden.

Die Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon scheint allerdings bzgl. der Transplantatüberlebenszeiten das potentere Mittel zu sein, da die Überlebenszeit der mit CSA behandelten Tiere kürzer ausfiel wie in der Studie mit MPL.

5.1.2. Immunhistochemische Untersuchung

Die Zellinfiltration von immunkompetenten Zellen als Marker für die Stärke und Zusammensetzung der immunologischen Reaktion auf den Transplantatstimulus wurde an den Tagen 1 p.tx. und 7 p.tx. untersucht. So konnte auch eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Zellinfiltration unter diesen Therapieregimes gemacht werden.

Da ein unbehandelt abstoßendes Tier das Transplantat innerhalb der ersten 24 Stunden abstößt, war vor allem das immunhistologische Zellprofil am Tag 1 p.tx. von Bedeutung. Ein weiterer Gradmesser für die Ausprägung der Abstoßungsreaktion war die Anfärbung der Marker für die Zytokinausschüttung als auch die Expression von MHC KI-II Molekülen. Auch die Expression der Glykoproteine (ECM) Fibronectin und Tenascin war Untersuchungsgegenstand. Letzteren wird eine Schlüsselfunktion für die Ermöglichung der Adhäsion und Migration von immunkompetenten Zellen innerhalb der Abstoßungsreaktion zugeschrieben (121,122,123,124). Insofern ist ihre Expressionsstärke als Marker für die Ausprägung der Abstoßungsreaktion zu sehen.

Bei der Negativkontrolle im Zuge einer immunhistologischen Untersuchung von isologen Herztransplantaten aus unbehandelten Tieren fand sich an den beiden Untersuchungstagen ein insgesamt zellarmes Infiltrat mit wenig T-Lymphozyten, Makrophagen. Es kam zu einer geringen Expression von MHC KI.-II Antigenen. Die Anfärbung der Zytokine und Glykoproteine war ebenfalls schwach . Dieses Zellbild stimmt insofern mit den von Padberg et al. beschriebenen (125) überein.

Im Gegensatz dazu zeigten die Schnitte der allogenen Herztransplantate aus unbehandelten Tieren (Positivkontrolle) eine massive zelluläre Infiltration. Dieses Infiltrat bestand vornehmlich aus mononucleären Phagozyten und den untersuchten Zelltypen der T-Zellreihe. Ebenfalls war eine starke Infiltration von B-Zellen zu beobachten. Es wurden hohe Aktivitätsmarker für MHC KI.-II

Antigen gefunden. Es kam zu einer hohen Ausschüttung der detektierten Zytokine IFN- γ und TNF- α , auch Fibronectin wurde sehr stark exprimiert ebenso wie Tenascin am Tag 7 p.tx..

Das Gesamtzellinfiltrat war am Tag 1 p.tx. stärker ausgeprägt als am Tag 7 p.tx. Dieses Untersuchungsergebnis repräsentiert die von Kupiec-Weglinski und Di Stefano beschriebenen Verhältnisse bei einer akzelerierten Abstoßung (102,103,127).

Bei der Versuchsgruppe mit Spendervorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung durch RPM lag die Gesamtzellzahl im Transplantat um 71 % niedriger am Tag 1 p.tx., sowie um 73 % niedriger am Tag 7 p.tx.. Es waren alle untersuchten Zellreihen bedeutend supprimierter im Transplantat vorhanden, es kam zu einer niedrigeren Expression von MHC Kl.-II Antigen. Auch die Werte für IFN- γ und TNF- α waren supprimiert, ebenso die Expression von Tenascin. Einzig Fibronectin war etwa in gleicher Höhe wie bei der Kontrolle nachweisbar. Insofern kann man von einer suppressiven Wirkung auf die akzelerierte zelluläre Abstoßungsreaktion unter diesem Therapieregime sprechen.

Bei der Gruppe mit alleiniger Spendervorbehandlung mit CSA ist vergleichbares festzustellen. Die Gesamtzellzahl der ins Transplantat infiltrierenden Zellen ist ebenfalls niedriger als die der Kontrolle. Gleiches trifft im einzelnen für die untersuchten Zellreihen zu, insbesondere für die der T-Zellreihe.

Es kommt auch hierbei zu einer verminderten Expression von MHC Kl.-II Antigen sowie zu einer Suppression des Tenascins. Auch bei dieser Untersuchung imponiert die starke Anfärbung des Fibronectins.

Interessanterweise ist die Gesamtzellinfiltration bei der Versuchsgruppe mit alleiniger Spendervorbehandlung niedriger als bei der Versuchsgruppe mit der Kombination aus Spendervorbehandlung mit Akzeptorbehandlung. Auch sind dementsprechend die Einzelwerte für die untersuchten Zellreihen, sowie die zu exprimierenden Aktivitätsmarker auf den Zelloberflächen niedriger.

Dies steht allerdings vornehmlich in einer Diskrepanz zu den sehr kurzen Transplantatüberlebenszeiten dieser Versuchsgruppe. Eine Erklärung könnte in der Abstoßungsreaktion selbst begründet liegen, da nach erfolgter früher fulminanter akzelerierter Abstoßung die Perfusion dieser Transplantate durch eine intravaskuläre Thrombosierung verloren geht. In das von der Perfusion ausgeschlossene ischämische Transplantat können keine immunkompetenten Zellen des Akzeptororganismus angeschwemmt werden. Die immunologische Reaktion ist nur noch auf dem Weg der Gewebemigration von den Transplantataussenflächen her möglich.(31,102). Die Transplantate wurden jedoch nach einem sehr kurzen Zeitintervall der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt.

Daß es demgegenüber zu niedrigeren Zellinfiltrationsraten als bei der Kontrollgruppe kommt wäre dann einer CSA-Wirkung im Transplantat zuzuschreiben, die aber nicht ausreichte, um eine Abstoßung zu verhindern . Unter Verwendung einer anderen immunsuppressiven Therapieform machten Tilney et al. bei ihren Versuchstieren eine ähnliche Beobachtung (126).

De Bruin fand in einer Studie, in der es ebenfalls um den Effekt einer Spendervorbehandlung u.a. mit CSA ging, heraus, daß dieses Therapieregime ein Mittel zur Verhinderung einer GVHD sei, aber auch zu akzelerierten Abstoßung führt (94). Diese Untersuchung fand von vornherein im

akuten Abstoßungsmodell statt. Bei dieser Untersuchung war eine alleinige Spendervorbehandlung

mit 50 mg/kg/d CSA an den Tagen -2, und -1 erfolgreich. Die Herztransplantate überlebten bis zu 22,1 Tage.

Interessant ist der beschriebene Zusammenhang zwischen diesem Therapieregime im akuten Modell und der beobachteten Nebenwirkung einer akzelerierten Abstoßung. Dies wäre ein Erklärungsansatz für die in dieser Studie beobachtete niedrigere Zellinfiltration in der Gruppe mit alleiniger Spendervorbehandlung mit CSA, welches in diesem Therapieansatz zu wirken scheint. Bzgl. der niedrigen Transplantatüberlebenszeit war vermutlich die Dosis von 10 mg /kg/d zu niedrig gewählt, zudem ist hierbei bereits im akzelerierten Modell gearbeitet worden.

Die wirksame Suppression der Zellinfiltration durch Spendervorbehandlung innerhalb des akzelerierten Abstoßungsprozesses wird in diesen beiden Untersuchungen deutlich. Besonders hervorzuheben ist weiterhin die Versuchsgruppe der Spendervorbehandlung mit CSA in Kombination mit der Akzeptorbehandlung durch RPM. Daß eine solche Vorbehandlung greift, besonders in Kombination mit einer Akzeptorbehandlung mit RPM, stellten Schmidbauer et al. im gleichen Abstoßungsmodell bereits dar, hier allerdings mit einer Donorbehandlung durch MPL. Auch bei dieser Untersuchung kam es zu einer supprimierten Zellinfiltration im Transplantat (91). Allerdings kam es bei dieser Untersuchung zu einer Zunahme von mononucleären Zellen und Makrophagen am Tag 1 p.tx.. Dieses Ergebnis konnten wir nicht beobachten.

In der bereits erwähnten Studie von de Bruin hatte allerdings die Kombination aus Spendervorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit CSA in der Effektorphase keine besseren Ergebnisse geliefert als die alleinige Vorbehandlung mit CSA (94). Auf diese Studie übertragen, erscheint die Kombinationsbehandlung mit CSA und RPM potenter zu sein.

5.1.3 Flowzytometrische Analyse zirkulierender Antikörper

Bei der Kontrollgruppe unbehandelt abstoßender Tiere stellt sich die IgM- und IgG-Alloantikörper- Antwort im Sinne eines typischen Verlaufes innerhalb eines akzelerierten Abstoßungsprozesses dar. Die IgM-Alloantikörperantwort beginnt in der Sensibilisierungsphase bis zum Tag der Transplantation stark anzusteigen, um dann erst nach ca. 4-5 Tagen wieder etwas abzufallen. Diesem Verlauf entgegengesetzt verhält sich die IgG-Antikörperantwort, bei der man erst am Tage 1 p.tx. in der Effektorphase einen ernsthafte Anstieg verzeichnen kann. Ab diesem Tag kann man von einem Umschalten des Organismus von der IgM- auf die IgG- Antwort sprechen.

Die starke Zunahme der Antikörpertiter in unbehandelten akzeleriert abstoßenden Ratten beschrieben in ähnlicher Weise bereits Di Stefano et al.(102). Hier wurde ein Gesamtantikörperanstieg innerhalb der ersten 48 Std. nach dem Transplantationsreiz der Hauttransplantation (Sensibilisierungsphase) festgestellt .

Bei der Versuchsgruppe mit Spendervorbehandlung mit CSA in Kombination mit einer Akzeptorbehandlung durch RPM kommt es während des gesamten Untersuchungszeitraumes zu

keiner nennenswerten IgM-Alloantikörperproduktion. Ebenfalls die IgG-Antwort der transplantierten Organismen bleibt relativ konstant auf einem niedrigen Niveau. Man kann also unter diesem Therapieregime von einer Suppression der Immunantwort auf der humoralen Ebene sprechen.

Bei der Versuchsgruppe mit Spendervorbehandlung durch CSA ohne Akzeptorbehandlung gelten im Prinzip gleiche Verhältnisse wie in der Versuchsgruppe mit Akzeptorbehandlung.

Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Schmidbauer et al. überein, die bei einer Vorbehandlung mit MPL gemacht wurden (91). Allerdings wird in jener Studie nur von supprimierten Alloantikörpertitern bei der Kombinationsbehandlung vom MPL mit RPM berichtet. Dies ist im Zusammenhang zu sehen mit der Beobachtung, daß eine alleinige Akzeptorbehandlung in der Effektorphase mit RPM uneffektiv ist (120). Diese Beobachtung und die in dieser Studie gewonnenen belegen die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung auch auf die humorale Immunantwort des Akzeptors. Diese These wird unterstützt durch die Ergebnisse von Hancock et al. der CSA eine Potenz zur Blockade der humoralen und zellulären Komponenten der Immunantwort innerhalb des Transplantates zuschreibt (103).

5.1.4. Gemischte Lymphozytenreaktion

Die gemischte Lymphozytenreaktion sollte in dieser Studie die Fähigkeit zur Erkennung körperfremder MHC-Genprodukte durch T-Zellen der Akzeptortiere unter einer Spendervorbehandlung überprüfen. Für diese Untersuchung wurde ausschließlich die Versuchsgruppe der Tiere mit zusätzlicher Akzeptorbehandlung vorgesehen. Innerhalb dieser Untersuchung kam es am Tag 3 p.tx. zu einer schwachen Wirkung der T-Zellen auf das spenderspezifische Antigen durch die Responderzellen der therapierten Empfängertiere. Das Ergebnis am Tag 5 p.tx. kann mit einer moderaten Suppression beschrieben werden.

Obwohl man durch die CSA-Wirkung eher eine Suppression erwarten dürfte, fällt diese am Tag 5 p.tx. eher schwach aus.

Diese Beobachtung wurde allerdings ebenfalls von Bordes-Aznar et al. gemacht (128). Bei dieser Untersuchung wurde davon ausgegangen, daß CSA seine Wirkung am Tag 3 p.tx. noch nicht suffizient ausübt. Zu ähnlichen Überlegungen kamen auch Kupiec-Weglinskiet et al., die eine Wanderung von Suppressorzellen aus den Lymphknoten in die Milz in der Frühphase nach einem allogenen Stimulus detektierten (8). So enthielten wahrscheinlich die Lymphknoten zur Zeit der Entnahme für die MLR vornehmlich reaktive T-Zellen. Dies wäre eine Erklärung für die stimulierende Wirkung innerhalb der MLR zu diesem frühen Zeitpunkt.

Auch muß man die RPM-Wirkung in diese Überlegungen mit einbeziehen, da die untersuchten Tiere bereits ab dem Transplantationstag mit RPM behandelt wurden. Es ist bereits bekannt, daß RPM in MLR-Untersuchungen einen starken proliferierenden Effekt auf die Responderzellen ausübt, im Gegensatz zur RPM-Wirkung in vivo. Diese Beobachtungen machten bereits Mohacsi et al.(129) und Schmidbauer et al.(120). Die Erklärung hierfür könnte darin zu sehen sein, daß möglicherweise Zellen existieren, die auf eine Therapie mit Rapamycin hin proliferieren und eine Regulatorfunktion besitzen (120).

Zumindest ist die eher schwach ausgeprägte proliferierende Reaktion der Responderzellen am Tag 3 p.tx. und die bereits einsetzende suppressive Reaktion am Tag 5 p.tx. durchaus mit den

anderen als positiv zu bewertenden Ergebnissen, in Hinsicht auf die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung, in Einklang zu bringen.

5.1.5 Schlußfolgerungen zur Spendervorbehandlung mit CSA

Daß es Anhaltspunkte für die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung mit CSA gibt, ist bereits von anderen Arbeitsgruppen bewiesen worden. So wiesen bereits Cederna et al. nach, daß die Spendervorbehandlung mit CSA zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit von Hauttransplantaten führte (130). In einer ähnlichen Studie von de Bruin et al. wurde die Effektivität einer alleinigen Spendervorbehandlung mit CSA in einem akuten Abstoßungsmodell bei Ratten belegt (94). Die Wirksamkeit einer kombinierten Spendervorbehandlung bestehend aus einer Vorbestrahlung und der Applikation von CSA fanden Jensen et al. in einem xenogenem Transplantationsmodell bei Ratten (95). Sowohl in den Untersuchungen von Sharma et al. (131) als auch Parikh et al. (132) wurden längere Transplantatüberlebenszeiten bei einer Spendervorbehandlung mit CSA propagiert.

In dieser Studie wurde eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeiten bei einer Spendervorbehandlung in Kombination mit einer Akzeptorbehandlung durch Rapamycin beobachtet. Diese Untersuchungen fanden im akzelerierten Modell statt. Bis auf die Untersuchungen von Schmidbauer et al. zur Spendervorbehandlung mit MPL (91) ist dies erst die zweite erfolgreiche Untersuchung, welche die Spendervorbehandlung im akzelerierten Modell betrifft.

Die weiteren Untersuchungsmethoden bewiesen unter diesem Therapieregime weitere Anhaltspunkte für eine erfolgreiche CSA-Wirkung in den Transplantaten und somit auch zu einer effektiven Suppression der Immunantwort des Akzeptors. Sowohl bei der Versuchsgruppe mit Akzeptorbehandlung als auch bei der Versuchsgruppe ohne Akzeptorbehandlung konnte eine verminderte zelluläre und humorale Immunantwort detektiert werden. Die gemischte Lymphozytenreaktion ergab Anhaltspunkte einer Suppression durch die CSA-Wirkung.

Vor dem Hintergrund, daß eine alleinige Akzeptorbehandlung in der Effektorphase uneffektiv zu sein scheint (120), müssen die beobachteten Wirkungen vor allem dem Cyclosporin zugewiesen werden. Als eine Hauptwirkung von CSA wird die Suppression von Cytokinen innerhalb des Transplantates angesehen (133,134,103). Dies bewirkt eine suppressierte Produktion von IL-2 und IFN- γ sowie wahrscheinlich auch von anderen Cytokinen, inklusive IL-4. Dies wird als Erklärung für die inhibitorischen Effekte auf die humorale Immunantwort angesehen (135). Auch wirkt CSA inhibitorisch auf die T-Zell abhängige Antigenexpression, Alloantikörperantwort, zytotoxische Antikörperantwort und die frühe IgG-Antwort (136,137). Diese Wirkungen sind mit den Beobachtungen dieser Studie in Einklang zu bringen.

CSA scheint daher bereits seine Wirkung vor der Transplantation im Spender, vor allem auf die T-Zellen innerhalb des Transplantates, zu entfalten, so daß der direkte Weg der Antigenerkennung auf diese Weise wirksam unterbunden wird. Die direkte Antigenerkennung, vor allem durch die sog. "passenger leukocytes" verursacht, wird als eine der Hauptwirkungen der schnellen Transplantatabstoßung angesehen (138,58,60,61,87).

Die Unterbindung dieses Weges der Antigenerkennung durch eine Spendervorbehandlung mit CSA scheint wirksam zu sein. Am potentesten hat sich dabei die Kombinationsbehandlung, des Spenders mit CSA und des Empfängers mit RPM erwiesen. Bei der alleinigen Spendervorbehandlung mit CSA ergaben lediglich die Werte zur Transplantatüberlebenszeit

unbefriedigende Ergebnisse, der Gesamteindruck der Untersuchungen zu dieser Versuchsgruppe unterstützt aber durchaus die Anhaltspunkte für die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung durch Cyclosporin A.

5.2. *Spendervorbehandlung mit Rapamycin*

5.2.1. Bestimmung der Transplantatüberlebenszeiten

Wurden die Spendertiere mit Rapamycin vorbehandelt sowie die Empfängertiere in der Effektorphase mit RPM behandelt, so konnte eine durchschnittliche Transplantatüberlebenszeit von 2 ± 1 Tagen beobachtet werden. Die alleinige Behandlung der Spender mit RPM ergab eine durchschnittliche Überlebenszeit der Transplantate von $1,14 \pm 0,38$ Tagen.

Unbehandelt akzeleriert abstoßende Tiere stießen die Transplantate nach $1,1 \pm 0,2$ Tagen ab. Auch bei dieser Studie sind die Beobachtungen von Schmidbauer et al. hinzuzufügen, in denen eine alleinige Behandlung der Empfängertiere in der Effektorphase mit RPM uneffektiv war (120).

Die alleinige Spendervorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung ist demnach nicht effektiver als eine ausschließliche Akzeptorbehandlung mit RPM ab dem Transplantationstag. Diese beiden Therapiestrategien bringen keine effektive Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Einzig bei der Kombinationsbehandlung von Akzeptor und Donor war eine moderate Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit um durchschnittlich einen Tag zu erzielen.

Gleichwertige Ergebnisse beobachteten auch Chen et al. in einer Studie zur Spendervorbehandlung mit RPM in einem akuten Abstoßungsmodell bei Ratten (92). In dieser Studie wurden Nieren und Darm transplantiert. Diese Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, daß eine alleinige Vorbehandlung des Spenders mit RPM nur bescheidene Transplantatüberlebenszeiten erbrachte ($9,2 \pm 0,2$ Tage), wohingegen durch die Kombination aus Spendervorbehandlung mit RPM und Akzeptorbehandlung mit CSA eine ausgeprägte Verlängerung der Transplantatüberlebenszeiten ($75,6 \pm 23,3$ Tage) erreicht wurde.

Diese Verlängerung war ausgeprägter als bei einer ausschließlichen Akzeptorbehandlung mit CSA.

Ebenfalls in der Studie von Schmidbauer et al. zur Vorbehandlung mit MPL im akzelerierten Modell war eine Kombinationsbehandlung von Akzeptor und Donor erfolgreicher als die jeweilige Monotherapie (91).

Hayashi et al. konnten diese Verhältnisse in einem Hamster-zu-Ratten Xenontransplantationsmodell auch für FK 506 belegen (90). Auch bei dieser Studie war die

Kombinationsbehandlung von Spender und Empfänger mit FK 506 erfolgreicher als die ausschließliche Donorbehandlung mit FK 506.

Diese Ergebnisse unterbauen die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung mit RPM. Vornehmlich ist hierbei allerdings die Spendervorbehandlung mit RPM als zusätzliches, die immunsuppressive Effektivität steigerndes Therapieregime zu sehen.

5.2.2. Immunhistochemische Untersuchung

Bzgl. der Diskussion zu den Ergebnissen der Kontrollgruppe sei hierbei auf das Kapitel 5.1.2. verwiesen.

Bei der Versuchsgruppe mit Kombinationsbehandlung läßt sich feststellen, daß das Gesamtzellinfiltrat niedriger ausfiel als bei der Kontrollgruppe. Jedoch herrschten in allen untersuchten Zellreihen immer noch relativ hohe Zellzahlen vor, was insgesamt gesehen den Eindruck einer stattfindenden Immunreaktion macht. Es bestand vorwiegend ein mononucleäres Infiltrat. Bezüglich der T-Zellreihen überwiegen stimulierte- und T-Helferzellen in den Transplantaten.

Es kommt ebenfalls zu einer erhöhten Expression von MHC KI.-II Antigen. Die Reaktionen für Tenascin und IFN- γ fallen eher schwach aus. TNF- α war erhöht zu bestimmen. Auch in dieser Untersuchung imponierte eine starke Anfärbung des Fibronectins. Diese Verhältnisse waren über beide Untersuchungstage zu erheben, mit der Tendenz zur Zunahme des mononucleären Infiltrates, einer Zunahme der MHC-Antigen Produktion sowie mit einer Zunahme der Tenascinexpression. Bei allen anderen untersuchten Zellreihen ist eher eine dezente Depression am Tag 7 p.tx. zu verzeichnen.

Bei der untersuchten Gruppe zur Spendervorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung zeigte sich ein noch stärker ausgeprägtes Zellinfiltrat als bei der zuvor genannten Versuchsgruppe. Auch stimmen die Verhältnisse bzgl. der untersuchten Zellreihen in etwa mit den oben dargestellten Verhältnissen überein. Es imponieren nur die noch viel höheren Anfärbungsraten.

Insgesamt nähert sich das Ergebnis dieser Untersuchungsgruppen mehr dem der Kontrollgruppe an, wobei vor allem bei der Versuchsgruppe ohne Akzeptorbehandlung das Resultat dem der Kontrollgruppe entspricht. Hierzu ist zu bemerken, daß die Herzen bei dieser Versuchsgruppe zur Zeit der immunhistochemischen Untersuchung bereits abgestoßen waren. Insofern stimmen die Verhältnisse in diesen Transplantaten mit denen einer akzelerierten Abstoßung überein (102,103,127).

Man kann in dieser Untersuchung demnach von einer wirksamen, aber nicht sehr ausgeprägten Suppression der Zellinfiltration durch die Spendervorbehandlung mit RPM sprechen. Wird der Akzeptor nicht behandelt, kommt es insgesamt gesehen nur zu einer sehr schwachen Wirkung auf die zelluläre Immunantwort des Akzeptors. Anders bei der Kombinationsbehandlung, bei der sich eine wesentlich stärker supprimierte zelluläre Immunantwort feststellen läßt. Dies korreliert mit den besseren Transplantatüberlebenszeiten dieser Gruppe.

Hieraus ist zu Schließen das die Wirkung von RPM ausschließlich angewandt bei der Spendervorbehandlung als uneffektiv zu bezeichnen ist, gleiches gilt für die Wirkung von RPM bei der ausschließlichen Akzeptorbehandlung (120).

Demgegenüber ist die Kombination aus Vorbehandlung des Spenders mit RPM und anschließender Behandlung des Akzeptors mit RPM durchaus erfolgversprechend.

Diese Beobachtung machten ebenfalls Chen et al. in ähnlichen Untersuchungen (92,93). Auch in der Untersuchung von Hayashi et al. wurden diese Wirkungen in ähnlicher Weise beschrieben (90), hier allerdings für FK 506, das dem Rapamycin sehr ähnlich ist (35).

5.2.3 Flowzytometrische Analyse zirkulierender Antikörper

Bei der Versuchsgruppe zur Spendervorbehandlung und Akzeptorbehandlung mit RPM stellt sich eine

insgesamt zu verzeichnende Suppression der humoralen Immunantwort dar. Sowohl die IgM-Alloantikörperantwort als auch die IgG- Alloantikörperantwort bleiben auf einem niedrigen, über die Untersuchungstage relativ konstant bleibenden Niveau.

Bei der Versuchsgruppe mit ausschließlicher Donorvorbehandlung kommt man grundsätzlich zum gleichen Ergebnis.

Auch in der Studie von Hayashi et al. kam es zu einer wirksamen Suppression der humoralen Alloantikörperantwort bei einer Spendervorbehandlung mit FK 506 (90). RPM und FK 506 haben in etwa die gleiche Wirkungsweise, da sie aus der gleichen Familie strukturverwandter antibiotischer immunsuppressiver Substanzen stammen (35).

Auch im Modell der Spendervorbehandlung scheint RPM seine bereits von Morris beschriebenen immunsuppressiven Wirkungen bzgl. der IgM- und IgG- Alloantikörperspiegel zu entfalten (113). Ebenfalls konnte ein Antikörpershift von IgM auf IgG verhindert werden, was ebenfalls eine bereits beschriebene RPM –Wirkung darstellt (115).

5.2.4 Gemischte Lymphozytenreaktion

Die gemischte Lymphozytenreaktion sollte in dieser Versuchsgruppe ebenfalls die Fähigkeit zur Erkennung körperfremder MHC-Genprodukte durch T-Zellen der Akzeptortiere unter einer Spendervorbehandlung mit RPM überprüfen. Für diese Untersuchung wurde ausschließlich die Versuchsgruppe der Tiere mit zusätzlicher Akzeptorbehandlung vorgesehen.

Es kam in dieser Untersuchung am Tag 3 p.tx zu einer recht starken Proliferation der T-Zellen auf das spenderspezifische Antigen durch die Responderzellen der therapierten Empfängertiere. Das Ergebnis am Tag 5 p.tx. fällt nicht sehr viel anders aus.

Diese paradoxe stimulierende Wirkung von RPM in MLR-Tests ist bereits bekannt und wird auch in dieser Studie bestätigt. Die gleichen Beobachtungen machten bereits Mohacsi et al. (129) und Schmidbauer et al. (120), vgl. 5.1.4.

Die Tatsache, daß diese stimulierende Wirkung in vitro mit einer eher suppressiven Wirkung in vivo einhergeht, muß auch in dieser Studie angenommen werden. Zumindest zeigte diese Versuchsgruppe durchaus positive Anzeichen einer Wirksamkeit des Therapieregimes bei den Transplantat-überlebenszeiten sowie bei der Untersuchung der zellulären und humoralen Immunantwort.

5.2.5 Schlußfolgerungen zur Spendervorbehandlung mit RPM

Auch bei dieser Therapiestrategie gibt es bereits Hinweise aus Voruntersuchungen von anderen Arbeitsgruppen zu deren Wirksamkeit. Vor allen zu nennen sind die Untersuchungen von Chen et al., bei denen in einem akuten Nieren- und Darmtransplantationsmodell bei Ratten gearbeitet wurde (92). Die alleinige Wirkung einer Spendervorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung fiel in dieser Studie im akuten Modell schwach aus. Weiterhin wurde in dieser Studie die Wirksamkeit einer Kombination aus Spendervorbehandlung mit RPM und einer Empfängerbehandlung mit CSA als weitaus effizienter klassifiziert.

Diese grundsätzlichen Beobachtungen konnten auch in dieser Studie gemacht werden. Allerdings ist die alleinige Spendervorbehandlung mit RPM ohne Akzeptorbehandlung im akzelerierten Modell als uneffektiv zu bezeichnen. Was die Kombinationsbehandlung aus Spender und Akzeptor betrifft, so sind auch in diesem akzelerierten Modell durchaus Anhaltspunkte für deren Wirksamkeit zu finden.

Da die alleinige Akzeptorbehandlung mit RPM in der Effektorphase ebenfalls uneffektiv war (120), ist die suppressive Wirkung auf die untersuchten humoralen und zellulären Immunmechanismen einer Wirkung von RPM im Transplantat zuzuschreiben, die sich bereits vor dem Transplantationsreiz manifestiert haben muß. Dieser Effekt von RPM ginge mit einer Beobachtung von Propper und Woo konform, bei der ein langdauerndes Ausbleiben einer Immunantwort vor allem auf humoraler Basis in nicht transplantierten Ratten gefunden wurde, die MHC-inkompatibles Blut erhielten und mit hohen Dosen RPM behandelt wurden (139).

Eine Übertragung einer wirksamen Gewebedosis auf den Empfängerorganismus durch das vorbehandelte Transplantat ist durch die Beobachtungen in dieser Studie bei der Versuchsgruppe mit Donorvorbehandlung ohne Akzeptorbehandlung als ausgeschlossen zu werten. Diese Aussage wird unterstützt durch die gleichlautende in der Studie von Chen et al. (92). Ebenfalls widersprechen dieser Vermutung die o.ä. Ergebnisse von Schmidbauer et al.(120).

Auch bei dieser Studie zur Vorbehandlung mit RPM scheint die Wirkung auf "passenger leukocytes" oder andere antigen-präsentierende Zellen (z.B.dendritische Zellen) im Transplantat eine der durchaus in Frage kommenden Erklärungen zu sein. Zu diesem Resultat kommen auch Chen et.al. (92).

Dies ist durchaus möglich, da RPM auf einem breiten Spektrum die T- und B-Zell aktivierenden Wege der Immunantwort zu supprimieren vermag (35). Auch ist bereits bekannt daß RPM innerhalb von Herztransplantaten in Ratten die Expression von Granzym B und vor allem IFN- γ (140) sowie TNF- α (141) zu supprimieren vermag. Es hat sich dabei gezeigt, daß gerade die

Suppression von TNF- α eine "downregulation" der Expression von Fibronectin bewirkt sowie eine Verminderung des zellulären Infiltrates (141). Die Auswirkungen dieser Phänomene konnten auch in dieser Untersuchung gezeigt werden.

Einzig die durch die gesamte Untersuchung (CSA+RPM) auftretende hohe Anfärbung des Fibronectins paßt nicht ganz in dieses Bild. Allerdings weist die insgesamt zu hohe Anfärbung innerhalb dieser Gesamtuntersuchung auf einen technischen Fehler bzgl. der Verdünnung des benutzten Antikörpers hin.

Insgesamt gesehen kommt man auch in der Untersuchung zur Spendervorbehandlung mit RPM zu dem Ergebnis, daß dieses Prozedere durchaus Wirkungen auf das Transplantat ausübt, die darauffolgend eine supprimierte Immunantwort des Transplantatempfängers induzieren können.

6. Zusammenfassung

Diese Studie sollte die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung mit den immunsuppressiven Substanzen Cyclosporin A und Rapamycin in einem akzelerierten Abstoßungsmodell untersuchen.

Hinter dieser konkreten Fragestellung stand das Phänomen der weiterhin zunehmenden Organknappheit und den immer noch als unzureichend zu bezeichnenden immunsuppressiven Therapiestrategien innerhalb der Transplantationsmedizin. Es stand daher vor allem die Frage nach einer Erweiterung des Spektrums an Organspendern zur Disposition. Eine sinnvolle Erweiterung dieses Spektrums wäre die Forcierung der Lebendspende wie bereits dargelegt, vgl. Kapitel 2. Hinzu könnte, um dieses spezielle Kontingent an Organspendern nochmals zu erweitern, der Risikospender/Empfänger (sensibilisiert, infiziert, etc.) miteinbezogen werden.

Der Vorteil, den man hätte, wenn man einen potentiellen Organspender präoperativ bereits suffizient immunsuppressiv anbehandeln könnte, liegt auf der Hand. Dies trifft in besonderem Maße auf den Risikospender zu. Hierzu fehlen allerdings weitestgehend suffiziente Therapiestrategien, da diese Verfahren in praxi noch kaum Verwendung finden.

Die Möglichkeiten, dieses Verfahren weiter zu erforschen und Ansätze zu effektiven Therapiestrategien zu finden, war die Zielsetzung dieser Studie. Es wurden bereits etablierte Immunsuppressiva verwendet, bei denen es schon Anzeichen über Wirksamkeitspotentiale innerhalb der Spendervorbehandlung gab. Die akzelerierte Abstoßung sollte die erschwerten Bedingungen bei einem Risikospender/Empfänger simulieren.

Es kamen in dieser Studie positiv zu bewertende Wirksamkeitsaspekte, sowohl von Cyclosporin als auch von Rapamycin, zum Vorschein. Beide Substanzen bewirkten beim Spender präop. angewandt eine in den einzelnen Untersuchungsmethoden zu verzeichnende Suppression der akzelerierten Abstoßungsreaktion durch den Empfänger. Es wurden Wirksamkeitsaspekte sowohl auf der zellulären Ebene als auch auf der humoralen Ebene nachgewiesen.

Die Wirkungen dieser beiden Substanzen waren in einer Kombination aus Spendervorbehandlung und einer Akzeptorbehandlung ausgeprägter. Dies trifft vor allem auf die Studie zur Vorbehandlung mit Cyclosporin zu. Hier scheint sich der schon vielbeschriebene synergistische

Effekt bei der Immunsuppression durch Cyclosporin in Verbindung mit Rapamycin darzustellen (35).

Vergleichend betrachtet war die Studie zur Vorbehandlung mit CSA erfolgreicher als jene mit RPM.

Dies ließ sich in allen Untersuchungen nachweisen. Es kam unter der CSA -Therapie zu längeren Transplantatüberlebenszeiten, zu niedrigeren Zellinfiltrationsraten, und zu einer niedrigeren Alloantikörperantwort. Auch wurde eine, wenn auch geringe, Wirksamkeit für CSA bei alleiniger Spendervorbehandlung registriert, die sich bei RPM nicht nachweisen ließ. Hierzu ist zu erwähnen, daß CSA bei ausschließlicher Akzeptorbehandlung in der Effektorphase suppressiv wirkt, im Gegensatz zu Rapamycin, welches nur sehr eingeschränkt wirkt (120). Dieses Versagen von RPM beobachtete bereits Morris, der feststellte, daß alleiniges Anwenden von RPM keine wirkungsvolle Suppression einer bereits präexistierenden Immunantwort bewirkt (35).

Demnach ist von einer synergistischen Wirkung innerhalb der RPM -Therapie auszugehen, und zwar jener die sich Transplantat auswirkt und jener, die sich im Akzeptor auswirkt. Da beide Wirkungen für sich alleine betrachtet kaum effektiv sind, aber bei einer Kombination der Therapiestrategien durchaus wirkungsvoll erscheinen, ist von einer Zusammenwirkung dieser beiden Einzelwirkungen auszugehen.

Das gleiche, wenn auch in noch stärkerem Maße, trifft für die Cyclosporintherapie zu. Eine CSA-Kombinationstherapie von Spender und Akzeptor hatte ähnliche Effekte wie die alleinige CSA-Therapie des Donors (94,130). Allerdings hat die Kombinationstherapie bestehend aus Donorvorbehandlung mit CSA und Akzeptorbehandlung mit RPM die insgesamt gesehen besten Ergebnisse geliefert. Dies ist ein weiterer Beweis für die sich potenzierend synergistische Wirkungsweise dieser Mittel.

Daß diese Therapiestrategien zu einer Wirkung innerhalb des Transplantates bereits in der präoperativen Phase führen, ist anhand dieser Studie anzunehmen. Es ist weiterhin anzunehmen, daß diese Wirkung hauptsächlich durch die spezifischen Wirkungen dieser Immunsuppressiva auf die sog. "passenger leucocytes" und anderer APC's, wie z.B. die dendritischen Zellen, zustande kommt. Hierbei ist die Wirkung in einer spezifischen Blockade der Aktivierung dieser Zellen und damit der Antigenexpression zu sehen.

Auch ist weiterhin denkbar, daß diese immunsuppressiven Substanzen in die Regulation der Extracellulären-Matrix-Proteine, vornehmlich des Fibronectins, eingreifen. Die Expression dieser ECM scheint zytokinabhängig zu sein (141). Gerade aber die Suppression der Cytokinproduktion ist eine der hervorstechenden Wirkungsweisen dieser beiden Immunsuppressiva. Da die extracellulären Matrixproteine wie Tenascin und Fibronectin an der Gewebemigration gerade auch der passenger leukocyten, der dendritischen Zellen und ebenfalls der immunkompetenten Zellen des Akzeptororganismus beteiligt sind (122,123,124,142), wäre hier ein weiterer Ansatzpunkt dieser Substanzen bereits innerhalb des Spenderorganismus zu sehen. Eine präoperative downregulation dieser Proteine würde während des Transplantationsreizes eine effiziente Gewebemigration in beide Richtungen verhindern.

Somit haben diese Ergebnisse Denkansätze geliefert, die bereits bestehende Thesen über die Biologie der Transplantatabstoßung mit einbeziehen und mitunter zu bekräftigen scheinen.

Diese Studie sollte die Wirksamkeit einer Spendervorbehandlung im akzelerierten Abstoßungsmodell untersuchen. Es sind Wirksamkeiten nachgewiesen worden. Sowohl die Therapie des Spenders mit Cyclosporin als auch die Therapie mit Rapamycin waren für sich gesehen erfolgreich. Bei der Therapie mit Cyclosporin kamen deutlich suffizientere Wirksamkeitsaspekte zum Vorschein.

Dennoch haben beide Therapiestrategien keine ausgeprägt lange Immunsuppression des Akzeptororganismus bewirkt. Es wurden die Transplantate nach ca. 2,55 Tagen (CSA) bei der erfolgreichsten Versuchsgruppe abgestoßen. Hierzu muß angemerkt werden, daß es bereits andere Studien gab, die auch innerhalb des akzelerierten Modells erfolgreicher waren. Hierbei sei auf die Studie zur Vorbehandlung des Spenders mit Methylprednisolon von Schmidbauer et al. verwiesen (91).

Allerdings wurde hierbei mit einem Immunsuppressivum gearbeitet, das auf einer viel breiteren Basis in die Immunantwort eines Organismus eingreift.

Trotzdem sind all diese Studien zu dem Ergebnis gekommen, daß die größte Effektivität von einer Kombination aus Spendervorbehandlung und der bereits etablierten Akzeptorbehandlung ausgeht. So auch in dieser Untersuchung.

Es sind der Erfolg dieser Studie und die Erfolge der anderen Studien als ein weiterer Schritt vorwärts innerhalb der Transplantationsmedizin zu sehen. Es zeigt sich, daß es durchaus positive Auswirkungen auf das große Problem der Transplantatabstoßung hat, wenn der Transplantatspender mit in das immunsuppressive Therapieregime einbezogen wird. Es zeigt sich weiterhin, daß bereits innerhalb dieser Therapiestrategien etablierte Medikamente wie Cyclosporin A, Rapamycin und auch Corticoide eine Wirkung innerhalb der Spendervorbehandlung entfalten können.

Es ist nun an der Zeit, diese weitere Option der immunsuppressiven Therapie innerhalb der Transplantationsmedizin weiterzuentwickeln, um sie dann mit in die bestehenden Therapiestrategien zu integrieren.

7. Literatur

1. Ranganathan KS. Karl Landsteiner. The man, his work and his achievements. J Indian Med Assoc. 1968
2. Eckhart WU. Geschichte der Medizin 2.Auflage. Springer-Verlag
3. Barnard CN. A human cardiac transplant. An interim report of a successful operation performed at Groote Shurr Hospital, capetown. S Afr.Med. J. 41, 1967
4. Medawar PB. The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. J Anat.78:176-199,1944
5. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. J Anat 78.299-314, 1943
6. Mitchinson NA. Passive Transfer of transplant immunity. Proc. Roy. Soc. London, Series B 142:72-87,1954
7. Colvin RB. Cellular and molecular mechanisms of allograft rejection. Ann. Rev. Med. 41:361-375, 1990
8. Kupiec-Weglinski JW, Tilney NL. The importance of lymphocyte migration patterns in experimental organ transplantation. Transplantation 40, 1-6, 1985
9. Kupiec-Weglinski J.W., Tilney NL. Migration patterns of Lymphocytes from recipients of organ allografts. Transplantation 32, 121-127, 1982
10. Kupiec-Weglinski JW. Graft rejection in sensitized recipients. Ann Transplant 1:34-40, 1996
11. Fabre JW, Milton S, Spencer A, Settaf A, Houssin D. Regulation of alloantigen expression in different tissues. Transplant Proc 19: 45-49, 1987
12. Dallmann MJ. Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. Cur. Opin Immunol 5:788, 1993
13. Nossal GJV. Immunological tolerance; collaboration between antigen and Lymphokines. Science 245:147, 1989
14. Milton AD, Spencer SC, Fabre JW. The effects of cyclosporine on the induction of donor class I and class II MHC antigens in heart and kidney allografts in rat. Transplantation 42 :337-347, 1986
15. Tsao TC, Xia W, Rodberg GM, Pinto ce, Kradin RL. Interferon -gamma and tumor necrosis factor-alpha promote the binding of dendritic cells to fibronectin. Pathobiology 62:120-126, 1994
16. Le Varlet B, Staquet MS, Dezutter-Dambuyant C, Delorme P, Schmitt D. In vitro adhesion of human epidermal Langerhans cells to laminin and fibronectin occurs through beta 1 integrin receptors. J Leukoc Biol 51:415-420, 1992
17. Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW. The biology of acute transplant rejection. Ann Surg 214:98-106, 1991

18. Snedire B, Schwartz R. Antigen specific proliferating T Lymphocyte clones: methodology, specificity, MHC construction and alloreactivity. *Immunological Reviews* 54:187, 1981
19. Hutchinson 4. Effector mechanisms in transplant rejection-An overview. In: Rose ML, Yacoub MH. *Immunology of heart and lung transplantation*, 2-21. Edward Arnold, London-Boston-Melbourne-Auckland, 1993
20. Tesi RJ, Elkhammas EA, Henry ML, Davies EA, Salazar A, Ferguson RM. Acute rejection episodes-best prior of long term primary cadaveric renal survival. *Transplant Proc* 25:901, 1993
21. Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 55:752, 1993
22. van Es A, Hermans J, van Bockel JH, Persijn GG, van Hoff JP, de Graeff J. Effect of warm ischemia and HLA(A and B) matching on renal cadaveric graft survival and rejection episodes. *Transplantation* 36:255, 1983
23. Leff JA, Repine JE. Blood cells and ischemia-reperfusion injury. *Blood* 16: 183, 1990
24. Koskinen PK, Krogerus LA, Nieminen MS, Mattila SP, Hayry PJ, Lautenschlager IT. Cytomegalovirus infection associated generalized immune activation in heart allograft recipients: a study of cellular events in peripheral blood and endomyocardial biopsy specimens. *Transplant Int* 7:163, 1994
25. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. Saunders Text and Review Series, Third Edition:160-163, 1997
26. Kissmeyer-Nielson F, Olsen S, Peterson VP. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with preexisting humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 2:662, 1966
27. Williams GM, Hume DM, Hudson RP, Morris PJ, Kano K, Milgrom F. Hyperacute renal homograft rejection in man. *N Engl J Med* 279:611, 1969
28. Ahern AT, Artruc SB, DellaPelle P, Cosimi AB, Russell PS, Colvin RB, Fuller TC. Hyperacute rejection of HLA-AB identical renal allografts associated with B lymphocyte and endothelial reactive antibodies. *Transplantation* 33:103, 1982
29. Weil TR, Clarke DR, Iwaki Y, Porter KA, Koep LJ, Paton BC, Terasaki PI, Starzl TE. Hyperacute rejection of a transplanted human heart. *Transplantation* 32: 71, 1981
30. Turka LA, Goguen JE, Gagne JE, Milford EL. Presensitization and the renal allograft patient. *Transplantation* 47:234, 1989
31. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. Saunders Text and Review Series. Third Edition: 370, 1997
32. Pichlmayr R, Wonigeit K, Nashan B. The importance of polyclonal and monoclonal antibodies as immunosuppressive Agents. *Perspective Transplantation*. Biotest GmbH, 9-12, 1996

33. Brattsröm C, Holt DW, Bäckmann L, Morales JM, Calne R, et al.. Concentration controlled dosing of Rapamune in renal allograft recipients to optimize Therapy. *Transplant Proc* 30:47, 1998
34. Morales JM, Wrammer L, Östraat Ö, Brattstöm C, et al.. Differences in renal function between sirolimus and cyclosporin: results from a randomized phase 2 trial. *Transplant Proc* 30:48, 1998
35. Morris RE. Rapamycin: FK 506's fraternal twin or distant cousin. *Immunology Today* 12:184-187, 1991
36. Miller J. Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil in renal transplant recipients: six month results of a multicenter, randomized dose ranging study. *Transplant Proc* 30:52, 1998
37. van Hooff J. State of the art: use of tacrolimus in renal transplantation. *Transplant Proc* 30:156, 1998
38. Kokado Y, Takahara S, Kyo M, Ichimaru N, Wang JD, Jing XQ, Miki T, Okuyama A. Low dose tacrolimus(FK506) based immunosuppressive protocol in living renal transplantation. *Transplant Proc* 30:1630, 1998
39. Chong ASF, Finnegan A, Xingli J, Gebel H, Sankara HN, Foster P, Williams JW. Leflunomide, a novel immunosuppressive agent. *Transplantation* 55: 1361, 1993
40. Xiao F, Chong A, Foster P, Sankary H, McChesney L, Williams JM, Frieders D, Williams JW. Leflunomide and acute rejection in hamster to rat cardiac xenografts. *Transplant Proc* 24:1263, 1994
41. Waldman WJ, Knight DA, Lurain N, Miller DM, Sedmark DD, Williams JW, Chong ASF. Novel mechanism of cytomegalovirus inhibition by leflunomide: activity against multi drug resistant isolates. *Transplant Proc* 30: 213, 1998
42. de Roover A, Williams A, Hubscher S, Candinas D, Antoniou E, Howie A, Drayson M, McMaster P, D'Silva M. Donor pretreatment with leflunomide has an adverse effect on rat cardiac allograft survival. *Transpl Immunol* 5:136-141, 1997
43. Allison AC. Approaches of the design of immunosuppressive agents. In: Thompson AW ed. *The molecular biology of immunosuppression*. New York: Wiley K, 179, 1992
44. Sollinger HW, Belzer FO, Deierhoi MH, Diethelm AG, Gonwa TA, et al. . RS-61443(mycophenolate mofetil): a multi-center study for refractory kidney transplant rejection. *Ann Surg* 216:513, 1992
45. Mericidita T. Improved long term renal graft survival with mycophenolate mofetil in patients experiencing delayed graft function. *Transplant Proc* 30: 50, 1998
46. Lebranchu Y. A randomized, double blind, multicenter trial comparing two corticosteroid regimens in combination with mycophenolate mofetil and cyclosporine in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 30: 51, 1998

47. van Gelder T, Hilbrands LB, et al. A randomized doubleblind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney Transplantation. *Transplantation* 68: 261-266, 1999
48. Jaffee BD, Jones EA, Loveless SE, Chen SF. The unique immunosuppressive activity of brequinar Sodium. *Transplant Proc* 25 suppl 2:77, 1993
49. Cramer DV, Chapman FA, Jaffee BD, Kones EA, Knoop M, Hrehaeiras, Makowka L. The effect of a new immunosuppressive drug, brequinar sodium, on heart,liver, and kidney allograft rejection in the rat. *Transplantation* 53:303, 1992
50. Antoniou EA, Deroover H, Howie AJ, Chondras K, McMaster P, D'Silva M. Immunosuppressive effect of combination shedules of brequinar sodium with leflunomide or tacrolimus on rat cardiac allotransplantation. *Microsurgery* 19 : 96-102, 1999
51. Wilhelm MJ, Pratschke J, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Donor brain death affects tempo and intensity of acute rejection of rat cardiac allografts. *Transplant Proc* 30:240, 1998
52. Kootstra G, Kievit J, Nederstigt A. Non-heartbeating Donors. *Transplant Proc* 30:191, 1998
53. Ruiz CM. Use of marginal donors in high risk patients. *Transplant Proc* 30:165, 1998
54. Sells RA. Informed consent from recipients of marginal donor organs. *Transplant Proc* 30:486, 1998
55. First MR. Immunological high-risk recipients strategies. *Transplant Proc* 30:162.1998
56. Koo DDH, Welsch KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Immunological differences between cadaver and living related donor renal allografts. *Transplant Proc* 30: 371, 1998
57. Cecka JM. Results of 1000 recent living unrelated donor transplants in th US. *Transplant Proc* 30 : 370, 1998
58. Lafferty KJ, Babcock SK, Gill RG. Prevention of rejection by treatment of the graft: an overview. *Prog Clin Biol Res* 224: 87-117, 1986
59. Hoffman LA, Codner MA, Shuster BA, Bogossian N, Egozi L, Harper AD, Steinman RM, LaTranta GS, Shires GT. Donor Leukocyte migration following extremity transplantation in an experimental model. *Plast Reconstr Surg* 90:999-1006, 1992
60. Richter N, Raddatz G, Graeter T, Schafers HJ, Schlitt HJ. Allogeneic Imphocyte chimerism after clinical lung transplantation. *Transpl Immunol* 3:74-80, 1995
61. Schlitt HJ. Chimerism in organ transplantaion. *Perspective Transplantation ,Biotest GmbH*, 21-22, 1996
62. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Teucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 339:1579, 1992

63. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, Kovoca M, Ricordi C, Ildstad S, Murase N. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 340:876, 1992
64. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ricordi C, Ildstad S, Terasaki P, Murase N, Kendall RS, Kocova M, Rudert WA. Chimerism after liver transplantation for type IV glycogen storage disease and type I Goucher's disease. *N Engl J Med* 328:745, 1993
65. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Thomson AW, Trucco M, Ricordi C. Donor cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs: a new view of organ transplantation. *Immunol Today* 14: 326, 1993
66. Schlitt HJ, Kanehiro H, Raddatz G, Steinhoff G, Richter N, Nashan B, Ringe B, Wonigeit K, Pichlmayr R. Persistence of donor lymphocytes in liver allograft recipients. *Transplantation* 96: 1001-1007, 1993
67. Schlitt HJ. Is microchimerism needed for allograft tolerance ?. *Transplant Proc* 29: 382-384. 1997
68. Richter N, Raddatz G, Steinhoff G, Schaeffers HJ, Schlitt HJ. Transmission of donor lymphocytes in clinical lung transplantation. *Transpl Int* 7:414-419, 1994
69. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, Ramos H, Todo S, Tzakis A, Fung JJ, et al.. Cell migration and chimerism after whole organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 17: 1127, 1993
70. Vossen J. Allogeneic bone marrow transplantation: relation between chimerism and immunity. *Verh K Acad Geneesk Belg* 60 :111-145 . 1998
71. Slavin S, Gurevitch O, Prigozhina T. A new Method for induction of bilateral transplantation tolerance of host vs graft and graft vs host based on balancing donor and host alloreactive T cells in mixed chimeras. *Transplant Proc* 30:95, 1998
72. Colby C, Shimizu A, Chang Q, Murphy M, et al.. Stable mixed chimerism and donor specific tolerance through peripheral blood stem cell transplantation. *Transplant Proc* 30:96, 1998
73. Wong W, Fry J, Hyde K, Morris PJ, Wood KJ. Hematopoietic stem cells transduced with a single donor class I MHC gene can induce operational tolerance in vivo. *Transplant Proc* 30:134, 1998
74. Ko S, Deiwick A, Dinkel A, Wonigeit K. Functional relevance of donor derived hematopoietic microchimerism of chronic rejection. *Transplant Proc* 30: 1393, 1998
75. Popma SH, Krasinskas AM, McLean AD, Eiref SD, Moore JS, Hruban RH, Rosengard BR. Tolerance of rat cardiac allografts does not require donor type passenger APC's. *Transplant Proc* 30:1422, 1998
76. Fuchimoto Y, Yamada K, Shimizu A, Yasumoto A, Sawada T, Sachs DH. Relationship between chimerism and tolerance in kidney transplantation. *Transplant Proc* 30:1185, 1998

77. Murase N, Ichikawa N, Ye Q, Chan HJ, Okuda T, Demetris AJ. Dendritic cells/chimerism/alleviation of chronic allograft rejection. *J Leucoc Biol* 66 : 297-300, 1999
78. Hisanaga M, Hundrieser J, Boker K, Uthoff K, Raddatz G, Wahlers T, Wonigeit K, Pichlmayr R, Schlitt HJ. Development, stability, and clinical correlations of allogeneic microchimerism after solid organ transplantation. *Transplantation* 61:40-45, 1996
79. Fuchimoto Y, Yamada K, Shimizu A, Yasamoto A, Sawada T, Huang CH, Sachs DH. Relationship between chimerism and tolerance in a kidney transplantation model. *J Immunol* 152 : 5704-5711, 1999
80. Ramrakha PS, Sharp RJ, Yeoman H, Stanley MA. The influence of MHC-compatible and MHC-incompatible antigen presenting cells on the survival of MHC-compatible cultured murine keratinocyte allografts. *Transplantation* 48:676-680, 1989
81. He YG, Niederkorn JY. Depletion of donor derived langerhans cells promotes corneal allograft survival. *Cornea* 15:82-89. 1996
82. Lee WP, Randolph MA, Weiland AJ, Yaremchuk MJ. Prolonged survival of vascularized limb tissue allografts by donor irradiation. *J Surg Res* 59: 578-588, 1995
83. McLean AD, Krasinskas AM, Eiref SD, Popma SH, Moore JS, Hruban RH, Rosengard BR. Hearts lacking donor type APC's develop CAV. *Transplant Proc* 30:1423, 1998
84. Steptoe RJ, Fu F, Drakes ML, LU L, Demetris AJ, Qian S, McKenna HJ, Thomson AW. Augmentation of dendritic cell in murine organ donors by Flt3 ligand alters the balance between transplant tolerance and immunity. *J Immunol* 159: 5483-5491, 1997
85. Qian S, Lu L, Li W, Pan F, Steptoe RJ, Chambers FG, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW. Donor pretreatment with Flt3 ligand augments antidonor T lymphocyte, natural killer, and lymphokine activated killer cell activities within liver allografts and alters the pattern of intra-graft apoptotic activity. *Transplantation* 65:1590-1598, 1998
86. O'Connell P, Adamma MJ, Levenson G, Heisey D, Meyer K, Love R, Burlingham W. Stable lung allograft outcome correlates with intra-graft persistence of donor derived leucocytes. *Transplant Proc* 30:1051, 1998
87. Soots A, Häyry P. Prolongation of rat cardiac allograft survival by donor pretreatment. *Transplantation* 5: 259-263, 1978
88. Kahn DR, Forrest De, Otto DA. Prolonged survival of rat cardiac allografts by donor pretreatment with methotrexate. Enhancement by combined immunosuppressant treatment of the recipient. *Transplantation* 51:697-700, 1991
89. Grochowiecki T, Gotoh M, Dono K, Otha Y, Kimura F, Ohzato H, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Pretreatment of crude pancreatic islets with mitomycin (MMC) prolongs islet graft survival in a xenogeneic rat to mouse model. *Cell Transplant* 7:411-412, 1998
90. Hayashi S, Ito M, Yasutomi M, Namii Y, Yokohama I, Uchida K, Takagi H. Evidence that donor pretreatment with FK 506 has a synergistic effect on graft prolongation in hamster to rat xenotransplantation. *J heart Lung Transpl* 14 :579-584, 1995

91. Schmidbauer G, Homeyer A, Bohle RM, Grimm H, Binder J, Kupiec-Weglinski JW. Donor pretreatment with methylprednisolone synergistically prolongs survival of cardiac allografts in sensitized rat recipients conditioned with rapamycin. *Transplant Proc* 29, 1997
92. Chen H, Xu D, Wu J, Luo H, Daloze P. Rapamycin graft pretreatment in small bowel and kidney transplantation in the rat. *Transplantation* 59:1084-1089, 1995
93. Chen H, Sehgal S, Daloze P, Wu J. Pretreatment of donors and grafts with rapamycin: the effect on graft survival and the tissue drug retention. *Clin Immunol Immunopathol* 76:321-323, 1995
94. de Bruin RW, Saat RE, Heineman E, Jeekel J, Marquet RL. Effects of donor retreatment with antilymphocyte serum on rejection and graft versus host disease after small bowel transplantation in immunosuppressed and nonimmunosuppressed rats. *Transpl Int* 6:22-25, 1993
95. Jensen IE, Steinbruchel DA, Nielsen B, Banggaard JP, Kemp E. Immunosuppressive effect of total body irradiation and cyclosporine A on graft survival and the lymphatic system in a cardiac hamster to rat transplantation model. *Transpl. Immunol* 2:52-55, 1994
96. Keown PA. The highly sensitized patient; Etiology, impact, and management. *Transplant Proc* 19 :74, 1987
97. Sanfilippo F, Goeken N, Niblack G, Scornik J, Vaughn WK. The effect of first cadaver renal transplant HLA-A, -B match on sensitization levels and retransplant rates following graft failure. *Transplantation* 47:240, 1987
98. Terasaki PJ, Gertson DW, Cecka JM, Takemoto S. Proposed HLA matching scheme for improved cadaveric kidney allocation. *Transplant Proc* 27:61, 1995
99. Groth CG. There is no need to give blood transfusions as pretreatment for renal transplantation in the cyclosporine era. *transplant Proc* 19:153, 1987
100. Opelz G. To transfuse or not before transplantation. In: Morris PJ, Tilney NL: *Transplantation Reviews*, vol 2. Philadelphia. PA:Saunders, 77, 1988
101. Schmidbauer G, Hancock WW, Wasowska BA, Sablinski T, Kupiec-Weglinski JW. Rapamycin treatment prevents and/or erases sensitization and abrogates accelerated rejection of vascularized organ allografts. *Transplant Proc* 25: 712-713, 1993
102. DiStefano R, Kupiec-Weglinski JW, Uhteg LC, Puskas J, Araneda D, Diamantstein T, Tilney NL. Modulation of accelerated rat cardiac allograft rejection by cyclosporine and ART-18. *Transplant Proc* 20:217, 1988
103. Hancock WW, DiStefano R, Braun P, Schweitzer RT, Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW. Cyclosporine A and anti interleukin 2 receptor monoclonal antibody therapy in rats suppress accelerated rejection of cardiac allografts through different effector mechanisms. *Transplantation* 49:416-421, 1990
104. Ono K, Lindsay ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57:225-229, 1969

105. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin: II The relationship between the antigens of blood and skin. *Br J Exp Patol* 27:15, 1946
106. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H . Biological effects of cyclosporine A: a new antilympocytic agent. *Agents and Actions* 6: 486, 1976
107. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H . Effects of the new antilympocytic peptide cyclosporine A in animals. *Immunology* 32:1017, 1977
108. Calne RY, White DJC, Roller K, Smith CP, Herbertson BM. Prolonged survival of pig orthotopic hesrt grafts treated with cyclosporine A. *Lancet* 1:1183, 1978
109. Green Cl, Allison AC. Extensive prolongation of rabbit kidney allograft survival after short term cyclosporine A treatment. *Lancet* 1:1182, 1978
110. Sayegh MH, Kut JP, Milford EL. Anti CD4 monoclonal antibody effects cellular hyporesponsiveness and prolongs renal allograft survival in the rat. *Hum Immunol* 26:131, 1989
111. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22.989), a new antifugal antibiotic. I. Taxonomy of producing the streptomycete and isolation of active priciple. *J Antibiot (Tokyo)*28:721, 1975
112. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22.989), a new antifungal antibiotic.Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot(Tokyo)* 28: 727, 1975
113. Morris RE . Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative, and immunosuppressive macrolides. *Transpl Rev* 6:39, 1992
114. Douros J, Suffness M .New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev* 8:63. 1980
115. Metcalfe SM, Richards FM .Cyclosporine, FK 506 and rapamycin: some effects on early actvation events of stimulated mouse spleen cells. *Transplantation* 49:789, 1990
116. Dumont FJ, staruch MJ, Koprak, Melino MR, Sigal NH . Disinct mechanism of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK 506 and rapamycin. *J Immunol* 144:251, 1990
117. Bierer BE, schreiber SL, Burakoff SJ. The effect of the immunosuppressant FK-506 on alternat pathways of T cell activation. *Eur J Immunol* 21:439, 1991
118. Wu J, Palladino MA, Figari IS, Morris RE . Comparative immunoregulatory effects of rapamycin, FK 506 and cyclosporine on mitigen induced cytokine production and lymphoproloiferation. *Transplant Proc* 23:238, 1991
119. Luo H, Chen H, Daloze P, Chang JY, St-Louis G, Wu J .Inhibition of in vitro immunoglobulin production by rapamycin. *Transplantation* 53:1071, 1992
120. Schmidbauer G, Hancock WW, Wasowska B, Badger AM, Kupiec-Weglinski JW . Abrogation by rapamycin of accelerated rejection in sensitized rats by inhibition of alloantibody responses an selective suppression of intragraft mononuclear and endothelial cell activation, cytokine production ,and cell adhesion. *Transplantation* 57:933-941, 1994

121. Coito AJ, Binder J, de Sousa M, Kupiec-Weglinski JW . The expression of extracellular matrix proteins during accelerated rejection of cardiac allografts in sensitized rats. *Transplantation* 27:599-605, 1994
122. Coito Aj , Kupiec-Weglinski JW . Extracellular matrix proteins: bystanders or active participants in the allograft rejection cascade ? *Ann Transplant* 1(3): 14-18, 1996
123. de Sousa M . Lymphocyte traffic and positioning in vivo: an expanded role for the ECM, the VLA proteins and the cytokines. *Pathol Res Pract* 190:840-850, 1994
124. Gould VE, Martinez-Lacabe V, Virtanen I, Sahlin KM, Schwartz MM . Differential distribution of teanscin and cellular fibronectins in acute and chronic renal allograft rejection. *Lab Invest* 67:71-79, 1992
125. Padberg WM, Lord RHH, Di Stefano R, Araneda D, Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW. Synergy between subtherapeutic doses of cyclosporine and immunologic enhancement in rat recipients of cardiac allografts. *Transplantation* 45:162-168, 1988
126. Tilney NL, Padberg WM, Lord RHH, Araneda D, Strom TB, Kupiec- Weglinski JW. Synergy between subtherapeutic doses of cyclosporine and immunobiological manipulations in rat heart graft recipients. *Transplantation* 46: 122-128, 1988
127. Di Stefano R, Uhteg LC, Hancock WW, Araneda D, Kupiec-Weglinski JW, Tilney NL . Host-Graft relationship in accelerated rejection of rat cardiac allografts. *Transplant Proc* 21 :496-497, 1989
128. Bordes-Aznar J, Lear PA, Strom TB, Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW . Kinetics of Cyclosporin A induced unresponsiveness to cardiac allografts in rats. *Transplant Proc* 15: 500-503, 1983
129. Mohacsi PJ, Morris RE . Brief treatment with rapamycin in vivo increases responsiveness to alloantigens measured by mixed lymphocyte response. *Immunology Letters* 34:217, 1992
130. Cederna J, Toledo-Pereyra LH, Gof S, Rios A, MacKenzie GH, Gordon DA . New avenues in the use of cyclosporine for transplantation. Graft and donor pretreatment. *Immunol Commun* 13:523-538, 1984
131. Sharma V, Toledo-Pereyra LH . Prolonged allograft survival in xenotransfused mice after graft and/or donor pretreatment with cyclosporine and /or concanavalin. *Transplantation* 43 :587-589, 1987
132. Parikh Y, Toledo-Pereyra LH, Finkelstein I, Bandlien K, Castellanos J, Mittal V . Prolonged pancreas transplant survival following graft donor pretreatment with cyclosporine A or concavalin A. *Transplant Proc* 19:4336-4339, 1987
133. Kupiec-Weglinski JW, Sablinski T, Hancock WW, DiStefano R, Mariani G, Mix CT, Tilney NL. Modulation of accelerated Rejection of cardiac Allografts in sensitized rats by anti-interleukin 2 receptor monoclonal Antibody and cyclosporine therapy. *Transplantation* 51:300-305, 1991

134. Ueda H, Hancock WW, Cheung YC, Diamantstein T, Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW. The mechanism of synergistic interaction between anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody and cyclosporine therapy in rat recipients of organ allografts. *Transplantation* 50:545, 1990
135. Granelli-Pierni A, Keane M, Steinman RM. Evidence that cyclosporine inhibits cell-mediated immunity primarily at the level of the T lymphocyte rather than accessory cells. *Transplantation* 46:53, 1988
136. Cunningham C, Power DA, Stewart KN, Catto GRD. The influence of cyclosporin A on alloantibody responses in inbred rats: provisional evidence for a serum factor with antiidiotypic activity. *Clin Exp Immunol* 72:130, 1988
137. Shih W, Hines WH, Neilson EG. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int* 33:1113, 1988
138. Benichou G. Direct and indirect recognition: The pathways of allograft immune rejection. *Front Biosci* 15: 476, 1999
139. Proper DJ, Woo J, MacLeod AM, Catto GRD, Thomson AW. The effects of rapamycin on humoral immunity in vivo. Suppression of primary responses but not of ongoing alloantibody synthesis or memory responses. *Transplantation* 54: 1058, 1992
140. Wieder KJ, Hancock WW, Schmidbauer G, Corpier CL, Wieder I, Kobzik L, Strom TB, Kupiec-Weglinski JW. Rapamycin treatment depresses intragraft expression of KC/MIP-2, granzyme B, and IFN-gamma in rat recipients of cardiac allografts. *J Immunol* 151: 1158, 1993
141. Coito AJ, Binder J, Brown LF, deSousa M, van de Water L, Kupiec-Weglinski JW. Anti-TNF-alpha treatment downregulates the expression of fibronectin and decreases cellular infiltration of cardiac allografts in rats. *J Immunol* 154:2949, 1995
142. Coito AJ, Korom S, Graser E, Volk HD, van de Water L, Kupiec-Weglinski JW. Blockade of very late antigen 4 integrin binding to fibronectin in allograft recipients: I. Treatment with connecting segment 1 peptides prevents acute rejection by suppressing intragraft mononuclear cell accumulation, endothelial activation, and cytokine expression. *Transplantation* 65:699, 1998

Danksagung:

Für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Schmidbauer herzlich bedanken.

Es sei weiterhin Herrn Prof. Dr. Schwemmler für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit innerhalb der Forschungseinrichtungen seiner Abteilung gedankt.

Bei Herrn Dr. Korom möchte ich für die Hilfestellung bezüglich der Flowzytometrischen Untersuchungen bedanken.

Auch Frau Gog und Frau Wilker sei gedankt für die labortechnische Unterstützung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name: Jens Ulrich Künzel

Wohnort: Am Salinengraben 18
59425 Unna

Geburtstag und –ort: 04.06.1970 in Salzkotten

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1976- 1980 Grillo-Grundschule in Unna

1980- 1990 Geschwister-Scholl-Gymnasium in Unna
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

06.1990- 31.05.1991 Luftwaffenausbildungsregiment 2, Budel, Niederlande

Studium

SS 1992 – WS 1994/95 Vorklinisches Studium:
Justus-Liebig-Universität Gießen

SS 1995 – SS 1997 Klinisches Studium: Justus-Liebig-Universität Gießen

WS 1997/1998 Urlaubssemester / Auslandsaufenthalt
(Baylor College of Medicine, Houston,Texas/ Texas Medical Center)

04. 1998 – 04.1999 Praktisches Jahr an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Lehrkrankenhaus: Stadtkrankenhaus Soest

01.08.1999-29.02.2000 Arzt im Praktikum in der Kerckhoff Klinik der Max-Planck-Gesellschaft
Abtl. für Thorax- und Kardiovaskularchirurgie
Leiter: Prof. Dr. Klövekorn
Bad Nauheim

seit 01.03.2000 Arzt im Praktikum am St. Johannes-Hospital Dortmund
Abtl. für Anästhesie und operative Intensivmedizin
Leiter: Prof. Dr. Sydow